

# **Zeitverlauf der Apoptose am Myokard nach prolongierter Ischämie im Vergleich von zwei Kardioplegieverfahren**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Lars Becker**  
geboren am 17. Januar 1978 in Darmstadt

01.08.2006

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Thorsten Wahlers, Köln

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Bauer, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. med. Christof Schmid, Regensburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.05.2007

**Für meine Eltern**

Diese Dissertation wurde gefördert durch das  
„Loder-Stipendium“  
für klinisch orientierte Forschung,  
verliehen durch den Förderverein des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V.  
und gestiftet von der Jenapharm GmbH & Co. KG, Jena.



## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrom</i>
AIF	Apoptose induzierender Faktor
Apaf-1	Apoptose Protease aktivierender Faktor 1
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Atrioventricular
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CAD	Caspase aktivierte DNase
CI	<i>Cardiac Index</i>
CK-MB	Herzmuskelspezifische Kreatinkinase
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
CoCl <sub>2</sub>	Kobaltchlorid
CPB	<i>Cardio-pulmonary bypass</i>
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
DFF40	DNA Fragmentations Faktor 40
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DR	<i>Death receptor</i> = Todesrezeptor
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
F	French = Charrière = $\frac{1}{3}$ mm Durchmesser
FADD	<i>Fas-associated death domain protein</i>
Fas	CD95 ( <i>cluster of differentiation</i> ) Rezeptor
FasL	Ligand für Fas
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration in %
FLIP	FLICE (früherer Name der Caspase 8) Inhibitorprotein
GTP	Guanosintriphosphat

---

h	Stunde(n)
HF	Herzfrequenz pro Minute
HK	Herzkammer
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HZV	Herz-Zeit-Volumen in l/min
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IAWBC	<i>Intermittend antegrade warm blood cardioplegia</i>
ISEL	<i>In-situ end labelling</i>
J	Joule
K <sup>+</sup>	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche in m <sup>2</sup>
l	Liter
M	Molar
MAP	Mittlerer arterielle Blutdruck in mmHg
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mbar	Millibar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPAP	Pulmonalarterieller Mitteldruck in mmHg
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> = Boten-Ribonukleinsäure
mval	Millival
n	Anzahl
n. s.	Nicht signifikant
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PaP	Peroxidase anti-Peroxidase
PAP	Pulmonalarterieller Druck in mmHg

PBS	<i>Phosphate buffert saline</i> = phosphatgepufferte Kochsalzlösung
P <sub>dias</sub>	Diastolischer Blutdruck in mmHg
PEEP	<i>Positive endexpiratory pressure</i> = positiver endexpiratorischer Druck in mbar
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
P <sub>sys</sub>	Systolischer Blutdruck in mmHg
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> = Sauerstoffradikale
r <sub>sp</sub>	Korrelationskoeffizient nach Spearman
S.	Seite
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale deoxynukleotidyl Transferase
TNFR	TNF-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRADD	<i>TNFR-associated death domain protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
tTG	Tissue Transglutaminase, Transglutaminase Typ II
TUNEL	<i>Terminal transferase mediatet dUTP nick end-labeling</i>
U	<i>Unit(s)</i> = Einheit(en)
UV	Ultraviolett
V.	<i>Vena</i>
VH	Vorhof
vs.	<i>Versus</i>
Vv.	<i>Venae</i>
ZVD	Zentralvenöser Druck in mmHg

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>11</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>13</b>
2.1 Apoptose	13
2.1.1 Definition und Geschichte	13
2.1.2 Morphologische Veränderungen	14
2.1.3 Ablauf der Apoptosekaskade	15
2.1.3.1 Signaltransduktion	16
2.1.3.2 Caspasen	17
2.1.3.3 Tissue Transglutaminase	18
2.1.3.4 Regulation der Apoptose	19
2.2 Nachweis von Apoptose in Zellen	20
2.3 Nekrose	21
2.3.1 Definition	21
2.3.2 Morphologische und biochemische Veränderungen	21
2.4 Apoptose in Herzmuskelzellen	22
2.5 Myokardprotektion	24
2.5.1 Definition und Geschichte	24
2.5.2 Techniken zur Myokardprotektion	25
2.6 Herz-Lungen-Maschine	26
2.6.1 Definition und Geschichte	26
2.6.2 Aufbau der Herz-Lungen-Maschine	27
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>29</b>
<b>4. Methodik</b>	<b>30</b>
4.1 Tierversuchsgenehmigung	30
4.2 Versuchsablauf	30
4.3 Immunhistochemie	36
4.3.1 Einbetten und Schneiden der Biopsien	36
4.3.2 In-situ end labeling (ISEL) von 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) durch terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT)	36
4.3.3 Färbung mit anti-Tissue-Transglutaminase (anti-tTG)	38

4.4 Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopie und Auswertung	38
4.5 Statistische Auswertung	40
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
5.1 Histologische Auswertung	41
5.1.1 Bestimmung der DNA-Fragmentation mit der ISEL-Methode	41
5.1.1.1 Auszählparameter	42
5.1.1.2 DNA-Fragmentationsrate	42
5.1.2 Morphometrische Messung der tTG-Expression	44
5.1.2.1 Berechnungsparameter	44
5.1.2.2 tTG-Expressionsrate	44
5.1.3 Korrelation der histologischen Marker	46
5.2 Messwerte der Versuche	47
5.2.1 Versuchstiere	47
5.2.2 EKZ-Zeiten	48
5.2.3 Hämodynamik- und Laborparameter	50
5.2.3.1 Herzfrequenz	51
5.2.3.2 Arterieller Mitteldruck (MAP)	52
5.2.3.3 Pulmonalarterieller Mitteldruck (MPAP)	53
5.2.3.4 Zentraler Venendruck (ZVD)	54
5.2.3.5 Cardiac Index (CI)	55
5.2.3.6 Laktat	56
5.2.3.7 pH	57
<b>6. Diskussion</b>	<b>58</b>
6.1 Versuchsaufbau	59
6.2 Immunhistochemie von Semidünnschnitten	60
6.3 Wertigkeit der Techniken zur Detektion von Apoptose	61
6.3.1 Nachweis der DNA-Fragmentation durch ISEL	62
6.3.2 Expressionsrate von Tissue Transglutaminase	64
6.3.3 Visualisierung mit Peroxidase anti-Peroxidase (PaP)	65
6.4 Interpretation der Ergebnisse	66
6.4.1 Diskussion der histologischen Auswertung	66
6.4.2 Diskussion der Hämodynamik und der Laborparameter	69
6.4.3 Zusammenhang von Apoptoserate und Hämodynamik	70

---

<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>74</b>
<b>8. Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>93</b>
9.1 Tierversuchsgenehmigung	93
9.2 Ehrenwörtliche Erklärung	95
9.3 Lebenslauf	96
9.4 Danksagung	97
9.5 Publikationen	98
9.6 Stipendium	99

## 1. Zusammenfassung

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, spielt eine fundamentale Rolle während der Embryogenese, der Wachstumsregulation in entwickelten Gewebsverbänden und ist essentieller Bestandteil der Funktion fast aller Zellen. Sie ist im Vergleich zur Nekrose ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, bei dem einzelne Zellen ohne begleitende Entzündungsreaktion untergehen. Es handelt es sich hierbei um einen phylogenetisch alten, hochregulierten kaskadenförmig ablaufenden Prozess, an dessen Ende der Tod der Zelle steht. Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben einen Zusammenhang der Apoptose und der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen aufgezeigt. Auch im Herzen gibt es Hinweise auf apoptotische Vorgänge, insbesondere im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusion im Myokard. Da die Umstände der postoperativen myokardialen Funktionseinschränkung nach herzchirurgischen Eingriffen noch immer nicht ausreichend aufgeklärt sind, stellt sich die Frage, ob und in welchem Anteil der Zelluntergang durch Apoptose hierbei beteiligt ist. Bis heute existieren nur einige wenige Arbeiten über den Zusammenhang von Kardioplegie und Apoptose und keine einzige die unterschiedlichen Kardioplegieverfahren vergleichende Studie.

Gegenstand der vorliegenden Promotionsarbeit ist die Untersuchung der Auswirkungen von verschiedenen Kardioplegieverfahren auf die Induktion von Apoptose nach prolongierter Ischämie und deren Korrelation mit der postoperativen Hämodynamik in einem Großtiermodell am Schwein.

Für diese Fragestellung wurde ein tierexperimentelles Modell entwickelt, welches den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine und die Gabe von Kardioplegielösungen sowohl antegrad über die Aortenwurzel als auch retrograd über den *Sinus coronarius* ermöglicht.

Es wurden insgesamt 21 Hausschweine mit einem Gewicht von ca. 24 kg in zwei Versuchsgruppen (Gruppen 1, 2) mit n = 8 und einer Kontrollgruppe (Gruppe 3) mit n = 5 eingeteilt. Alle Versuchstiere wurden narkotisiert und nach dem gleichen Versuchsprotokoll an eine Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Zur Induktion des künstlichen Herzstillstandes (Kardioplegie) erhielt Gruppe 1 eine retrograde Gabe von Kardioplegielösung nach Buckberg über den *Sinus coronarius*, Gruppe 2 eine antegrade Kardioplegiegabe nach Calafiore über die Aortenwurzel bzw. die Koronararterien. In der Kontrollgruppe 3 wurde nur ein kardiopulmonaler Bypass ohne Herzstillstand etabliert. Die Ischämiezeit in den Versuchsgruppen betrug jeweils 120 Minuten, darauf folgten in allen drei Gruppen eine Reperusionszeit und Entwöhnung von der Herz-Lungen-Maschine von insgesamt 45 Minuten

sowie eine Nachbeobachtungszeit von sechs Stunden. Es wurden stündlich die Hämodynamikparameter protokolliert sowie arterielle Blutproben entnommen und daraus Laborwerte bestimmt. Zur histologischen Untersuchung wurden je eine Myokardbiopsie aus dem rechten Vorhof sowie der rechten und linken Herzkammer jeweils vor und nach der Ischämiezeit und nach der sechsständigen Nachbeobachtungszeit entnommen und sofort in Formalin fixiert.

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde an Semidünnschnittserien der Biopsien die Expressionsrate des apoptoseassoziierten Proteins Tissue Transglutaminase und das Ausmaß von apoptosetypischen DNA-Doppelstrangbrüchen im Zellkern mit Hilfe der ISEL-Technik bestimmt.

Die beiden histologischen Marker Tissue Transglutaminase und die durch die ISEL-Technik gemessene DNA-Fragmentierung korrelierten mit  $r_{sp} = 0,749$  ( $p = 0.01$ ) positiv miteinander, es ergaben sich keine messtechnischen Ausreißer.

Als Ergebnis der vorliegenden Arbeit ergibt sich, dass die Kardioplegielösungen keinen Einfluss auf die Apoptoserate besitzen, denn es waren weder Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen noch im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweisbar. Bemerkenswert war eine schon vor Beginn der Ischämie vorhandene auffallend hohe gemessene Apoptoserate in allen Gruppen. Bei der Untersuchung der Hämodynamik und der Laborwerte zeigten sich nur in der Gruppe 1 eine signifikant erhöhte Herzfrequenz, ein erniedrigter arterieller Mitteldruck und ein erhöhter postischämischer Laktatwert. Bei der Korrelation der Apoptoserate mit der Pumpfunktion (*Cardiac Index*) des Herzens ergab sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Parametern.

Zusammenfassend ergibt sich kein Einfluss der untersuchten Kardioplegielösungen auf die Induktion der Apoptose im Kardiomyozyten. Auch zeigte sich kein Unterschied in den Protektionseigenschaften bezogen auf die postischämische Hämodynamik. Eventuelle langfristige Auswirkungen über Tage, Wochen und Monate können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die erhöhten Ausgangswerte der Apoptose noch vor der Ischämie werfen jedoch die Frage auf, in wie fern das Schwein als Modell zur Apoptosebestimmung geeignet ist und die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden können.



## 2. Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Ausmaß der Apoptoseinduktion in Herzmuskelzellen, die einer prolongierten Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt wurden.

Als Einführung in die Thematik folgt eine Übersicht über die morphologischen und molekularbiologischen Aspekte der Apoptose, eine Gegenüberstellung mit der Nekrose, sowie eine Darstellung der Grundlagen der extrakorporalen Zirkulation und der Myokardprotektion.

### 2.1 Apoptose

#### 2.1.1 Definition und Geschichte

Unter dem Begriff Apoptose versteht man eine Form des Zelltodes, der eine bedeutende Rolle während der embryonalen Entwicklung, der Reifung von Organsystemen, aber auch bei der Wachstumsregulation in entwickelten Geweben spielt. Die Apoptose ist darüber hinaus die natürliche Form der Zellmauserung und sorgt so für ein Gleichgewicht von Zellvermehrung und Zelluntergang. Dabei sterben gezielt einzelne Zellen im Gewebe ab, ohne eine Entzündungsreaktion im umgebenen Gewebe nach sich zu ziehen. Im Gegensatz zur Nekrose stellt sie einen aktiven, energieverbrauchenden und hoch regulierten Vorgang dar. Phylogenetisch ist die Apoptose zudem ein in hohem Maße konserviertes Programm, das in praktisch allen Zelltypen nachweisbar ist (Haunstetter und Izumo 1998, Riede 2004, Zatloukal et al. 2004).

In Studien der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass die Apoptose nicht nur in der Entwicklung und Gewebsmauserung eine Rolle spielt, sondern dass auch eine Vielzahl von Krankheiten durch eine Über- oder Unterregulation der Apoptose verursacht werden kann. So ist z.B. ein ursächlicher Zusammenhang von programmiertem Zelltod und neurodegenerativen Erkrankungen, Tumoren, AIDS und Herz-Kreislauf-Erkrankungen nachgewiesen worden (Narula et al. 1997, Anversa 2000, Riede 2004).

Schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts wurde vermutet, dass der „geplante“ Tod von Zellen eine wichtige Rolle in der Entwicklung mehrzelliger Organismen spielt. Flemming beschrieb 1885 bei seinen lichtmikroskopischen Untersuchungen an Granulosazellen ein halbmondförmiges, kondensiertes Chromatin in geschrumpften Zellen, deren Kern sich

schließlich auflöste. Diese von ihm beobachteten und als „Chromatolysis“ bezeichneten Zellveränderungen stimmen erstaunlich gut mit den später definierten morphologischen Veränderungen bei der Apoptose überein (Flemming 1885, Otsuki et al. 2003). Lockshin und Williams stellten 1964 die Hypothese vom programmierten Zelltod auf, der zu Folge der Zelltod in der Embryogenese nicht zufällig, sondern kontrolliert, schrittweise und in lokal bzw. zeitlich begrenztem Rahmen abläuft (Lockshin und Williams 1965, Lockshin und Zakeri 2001).

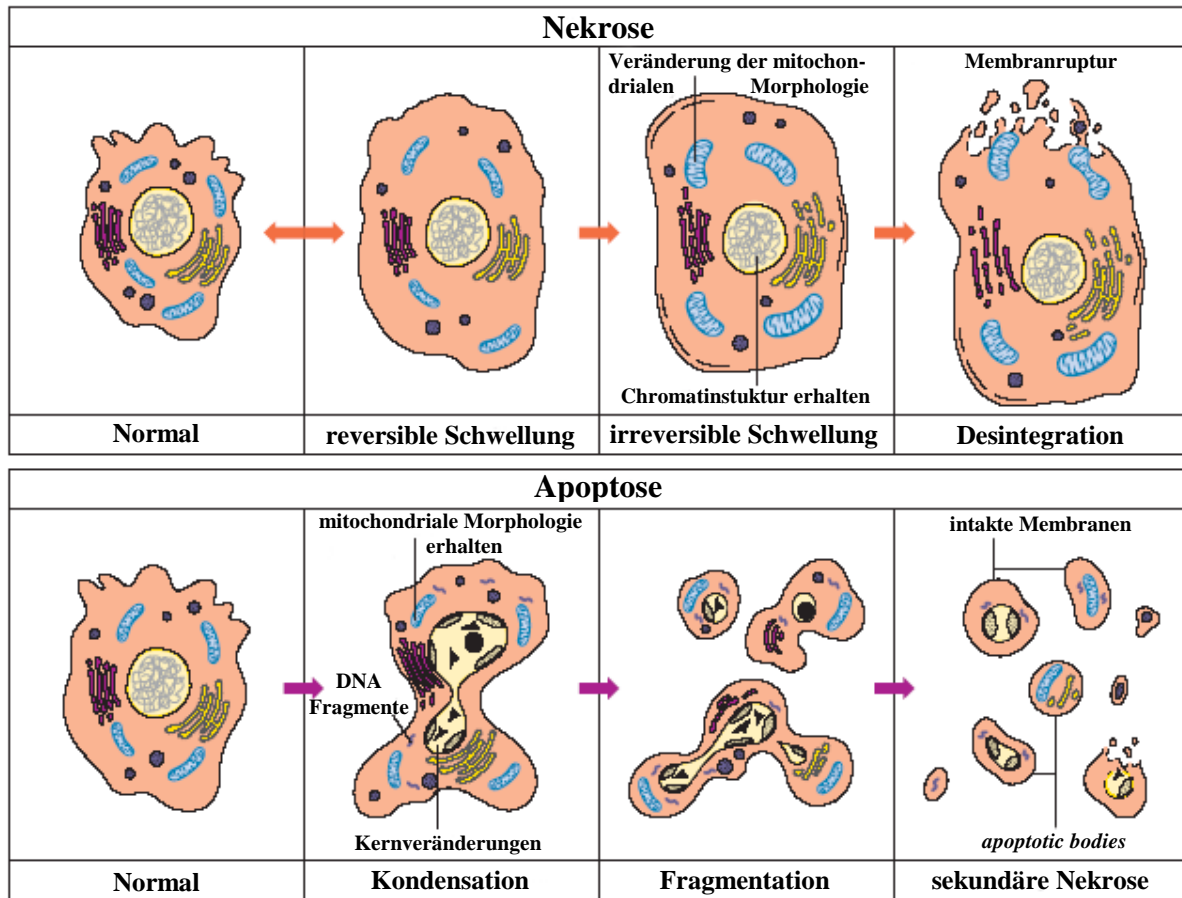
Der Begriff Apoptose wurde erst 1972 von Kerr, Wyllie und Currie in ihrem Artikel „*Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.*“ in die Literatur eingeführt. Er leitet sich von dem griechischen Wort *αποπτωση* „apoptein“ ab, das so viel wie „Herunterfallen“, z. B. von Blättern im Herbst, bedeutet. Sie bezeichneten damit den von ihnen erstmals elektronenmikroskopisch beobachteten und beschriebenen morphologischen Ablauf einer neuen Art von Zelltod (Kerr et al. 1972, Alberts et al. 2004).

Die fundamentale Bedeutung der Apoptose für die Biologie zeigt sich auch darin, dass 2002 S. Brenner, H. R. Horvitz und J. E. Sulston der Nobelpreis für Medizin und Physiologie für ihre Erforschung der Apoptosevorgänge verliehen wurde (Nobelprize.org 2002).

### 2.1.2 Morphologische Veränderungen

Der Beginn der Apoptose ist durch das Zusammenschrumpfen der Zelle und des Kernes charakterisiert. Im Kern kommt es zusätzlich zur Kondensation des Chromatins zu kleinen Klumpen, die sich an die Kernmembran anlagern (*blebbing*). Der Kern verdichtet sich immer mehr und es kommt letztlich zur Karyorrhexis. Die Zelle löst sich aus ihrem Zellverband, die Oberflächenstruktur wird unregelmäßig und es bilden sich kleine Blasen an der Zellmembran aus. Nun kommt es zu dem so genannten „*budding*“ der Zelle, bei dem sie in kleine membranumschlossene Vesikel zerfällt. Diese auch als „*apoptotic bodies*“ bezeichneten Vesikel enthalten neben den in ihrer Ultrastruktur noch intakten Zellorganellen und Membranen auch Fragmente des Kernes. Die „*apoptotic bodies*“ werden entweder von anderen Zellen phagozytiert oder gehen in einem der Nekrose entsprechenden Ablauf unter („sekundäre Nekrose“) (Kerr et al. 1972, Saraste 1999, Saraste und Pulkki 2000). Die Vorgänge, die den Ablauf der Apoptose charakterisieren, sind in einer Vielzahl von verschiedenen Zelltypen erstaunlich konstant (Wyllie 1987). So konnten viele Studien zeigen,

dass auch die Apoptose im Kardiomyozyten dem beschriebenen Ablauf folgt (Haunstetter und Izumo 1998, Takemura und Fujiwara 2006).



**Abb 2.1:** Morphologische Veränderungen bei Nekrose und Apoptose (modifiziert nach Eisel et al. 2000)

### 2.1.3 Ablauf der Apoptosekaskade

Für die Induktion der Apoptose sind mittlerweile eine ganze Reihe kaskadenartiger Prozesse auf molekularer Ebene nachgewiesen worden, an deren Ende die oben genannten morphologischen Veränderungen stehen. Diese repräsentieren somit lediglich eine sehr späte Phase in der gesamten Kaskade. Der erste Schritt besteht in der Aktivierung der molekularen Signalwege der Apoptose (Dispersyn und Borgers 2001). Dieser Mechanismus läuft entweder am Ende der Lebenszeit der Zelle nach ihrem eigenen „Selbstmordprogramm“ ab oder wird durch äußere Einflüsse in Gang gesetzt (Riede 2004). Über die genauen Vorgänge, die zur Aktivierung führen, ist noch wenig bekannt, bei Kardiomyozyten wurde jedoch nachgewiesen, dass mechanischer Stress (z.B. Überdehnung), neurohumorale Faktoren (z.B. Angiotensin II, Atrialer Natriuretischer Faktor) oder Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ ) eine Rolle spielen (Haunstetter und Izumo 1998, Sabbah 2000). Aber auch Ischämie und Reperfusion gelten,

z.B. über die Freisetzung von NO, als potente Trigger für myokardiale Apoptose (Feuerstein und Young 2000, Freude et al. 2000, Taimor et al. 2000, Zhao et al. 2000).

### 2.1.3.1 Signaltransduktion

Es sind mehrere unterschiedliche Signalwege zur Aktivierung der Enzymkaskaden in der Zelle beschrieben worden, die von den verschiedenen, den Zelltod initiiierenden, Stimuli abhängen (Slee et al. 1999). Die beiden wichtigsten Transduktionswege zur Aktivierung der Caspasen sind zum einen die *death domain*-Rezeptorkomplexe an der Zellmembran und zum anderen die mitochondriale Ausschüttung von Cytochrom-c (Haunstätter und Izumo 1998, Dispersyn und Borgers 2001) (Abb. 2.2).

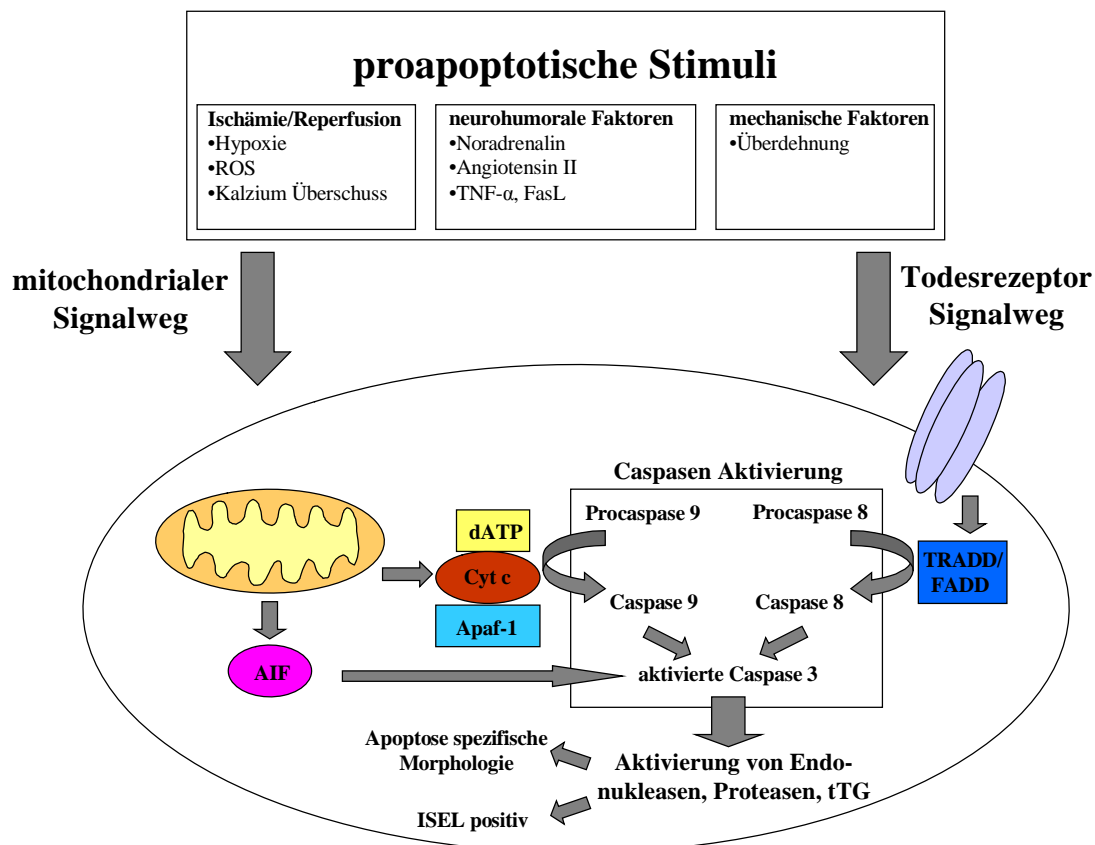
Die Aktivierung über die so genannten Todesrezeptoren gilt als einer der am besten untersuchten Signalwege. Bis jetzt sind mehrere unterschiedliche Typen dieser zu den TNF-Rezeptoren gehörenden Gruppe beschrieben worden, darunter Fas (CD95), TNFR-1, DR4, DR5. An diese Rezeptoren binden für sie spezifische extrazelluläre Proteine (z.B. TNF- $\alpha$ , FasL oder TRAIL), was zu einer Konformationsänderung führt. Dadurch interagieren intrazelluläre Proteine wie TRADD oder FADD mit den Rezeptoren, die dann die Procaspase 8 spalten und aktivieren. Die Caspase 8 ist bei diesem Signalweg das Schlüsselenzym zur Aktivierung der Apoptosekaskade (Haunstätter und Izumo 1998, Saraste und Pulkki 2000).

Die Mitochondrien spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Homöostase und dem Energiehaushalt der Zelle, sondern auch bei der Reaktion auf pathologische Einflüsse wie oxidativen Stress oder extremen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Gottlieb 2003). Durch verschiedene zytotoxische Stoffe (z.B. Zytostatika, Mikrobentoxine, UV-Strahlen), p53 oder Mitglieder der Bcl-2 Familie werden Kanalproteine in der mitochondrialen Membran geöffnet. Dabei kommt es zur Freisetzung des proapoptotischen Schlüsselenzyms Cytochrom-c und anderen caspasenaktivierenden Stoffen wie z.B. AIF in das Zytosol. Die Caspase 9 ist die wichtigste Caspase im mitochondrialen Aktivierungsweg und dient als Trigger für die Apoptosekaskade. Die Procaspase 9 bildet zusammen mit dem Cytochrom-c, Apaf-1 und dATP einen zytosolischen Komplex, das so genannte Apoptosom, und wird dadurch aktiviert (Slee et al. 1999, Saraste und Pulkki 2000, Dispersyn und Borgers 2001, Gottlieb 2003).

Weitere direkte Initiatoren der Caspasenkaskade sind Granzym B, MAP-Kinasen oder Änderungen der Zellhomöostase wie z.B. das Absinken des intrazellulären pH-Wertes, das Ansammeln von Sauerstoffradikalen, erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte und metabolischer Stress während Ischämie und Reperfusion (Gottlieb 2003).

### 2.1.3.2 Caspasen

Caspasen sind **Cystin-Aspartat-Proteasen**, die ihr Substratprotein spezifisch nach Aspartatresten spalten, kontinuierlich exprimiert werden und als inaktive Proenzyme im Zytosol vorhanden sind. Seit ihrer ersten Isolierung in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* sind aus der Familie der Caspasen bis jetzt 14 verschiedene Enzyme in Säugetierzellen nachgewiesen worden (Slee et al. 1999, Saraste und Pulkki 2000, Pistritto et al. 2002).



#### Legende:

AIF: Apoptose induzierender Faktor; Apaf-1: Apoptose Protease aktivierender Faktor 1; Cyt c: Cytochrom-c; dATP: Deoxyadenosintriphosphat; FADD: *Fas-associated death domain protein*; ISEL: *in-situ end labelling*; ROS: *reactive oxygen species*; TRADD: *TNFR-associated death domain protein*; tTG: *Tissue Transglutaminase*

**Abb. 2.2:** Schema der beiden wichtigsten Signalwege zur Aktivierung der Apoptose (modifiziert nach Dispersyn und Borgers 2001)

Einmal aktiviert, spalten die Caspasen wiederum weitere Caspasen und es resultiert eine sich selbst verstärkende proteolytische Kaskade (Abb. 2.2). Es kommt zur Spaltung von zellulären Schlüsselenzymen/Inhibitorenzymen und damit zur Aktivierung von DNAsen (DNase-1, DFF40, CAD) oder Regulationsenzymen (Proteinkinase C, tTG), aber auch zur Spaltung von

cytoskelettalen Proteinen (Actin, Gelsolin). Die hauptverantwortlichen Enzyme in der proteolytischen Kaskade sind die Caspasen 3 und 7 (Alberts et al. 2004, Faubel und Edelstein 2005, Lakhani et al. 2006)

Durch die aktivierten DNAsen kommt es an genau definierten Stellen zur Zerstückelung der DNA in etwa 180 - 200 bp lange Doppelstrangbruchstücke oder ein Vielfaches davon. Dies führt zu dem für die Apoptose typischen Leiterphänomen in der DNA-Gelelektrophorese und der positiven TUNEL- bzw. ISEL-Reaktion, welche allgemein anerkannte Nachweismethoden der Apoptoseinduktion darstellen (Saraste und Pulkki 2000).

### 2.1.3.3 Tissue Transglutaminase

Die Tissue Transglutaminase (tTG), auch Transglutaminase Typ II genannt, ist ein 87 kDa schweres Protein und wird beim Menschen auf dem Chromosom 20q12 kodiert (Ou et al. 2000, Boehm et al. 2002). Es ist nur in einigen wenigen Zelltypen physiologisch vorhanden und gehört zu den wenigen induzierten Genen während der Apoptose (Thomazy und Fesus 1989, Piacentini et al. 1991b). Eine positive Korrelation der Transkription ihrer mRNA mit apoptotischen Vorgängen konnte in vielen Studien für eine Vielzahl von Zellarten nachgewiesen werden (Piacentini et al. 1991a, Piacentini et al. 1991b, Nagy et al. 1997, De Laurenzi und Melino 2001).

Die tTG ist ein in der späten Phase der Apoptose aktiviertes  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Enzym, das vor allem irreversible Quervernetzungen, so genannte *crosslinks*, zwischen cytoplasmatischen Proteinen katalysiert. Diese Verbindungen führen zu einem großen stabilen und unlöslichen Proteingerüst, das die Zelle stabilisiert und das Freiwerden von intrazellulären Bestandteilen und Enzymen hemmt. Dies verhindert wirksam das Auftreten einer Entzündungsreaktion im Bereich der apoptotischen Zelle (Fesus et al. 1987, Piredda et al. 1997, Melino und Piacentini 1998, Amendola et al. 2002, Fesus und Piacentini 2002). Als Substrate der tTG gelten Tubulin, Actin, Histone, Fibronektin und andere intrazelluläre Proteine (Autuori et al. 1998, Melino und Piacentini 1998).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die tTG nicht nur als Transglutaminase fungiert, sondern ein multifunktionales Enzym ist. Sie aktiviert z.B. in Verbindung mit einem GTP-Proteinkomplex auch andere in der Apoptose involvierte Enzyme wie die rezeptorabhängige Phospholipase-c oder fördert die Freisetzung von Cytochrom-c aus Mitochondrien (Nakaoka et al. 1994, Song et al. 2003).

Durch diese Vernetzungsaktivität und die Aktivierung von anderen apoptosespezifischen Enzymen gilt die tTG als ein wichtiges Schlüsselenzym der Apoptose (Ou et al. 2000).

An Zelllinien von Promonozyten wurde nachgewiesen, dass die Inhibition der tTG-Expression zu einer erhöhten Überlebensrate nach künstlich induzierter Apoptose führt, was eine proapoptotische Funktion nahe legt (Oliverio et al. 1999). Ergebnisse neuerer Studien konnten jedoch auch antiapoptotische Wirkungen der tTG aufzeigen. So haben z.B. Boehm et al. demonstriert, dass tTG das Tumorsupressorgen p110 modifizieren und damit aktivieren kann, was zu einer Protektion gegenüber apoptotischen Stimuli führt (Boehm et al. 2002).

Die genaue Funktion der tTG im Zusammenhang mit der Apoptose ist also noch nicht endgültig geklärt, es kann aber davon ausgegangen werden, dass eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten tTG Expression und apoptotischen Vorgängen besteht (De Laurenzi und Melino 2001, Busch 2002, Tucholski und Johnson 2002, Mangala und Mehta 2005).

#### 2.1.3.4 Regulation der Apoptose

Da die Effektorproteine der Apoptosekaskade in jeder Zelle ständig vorhanden sind, ist es nicht verwunderlich, dass es strenge Regulationsmechanismen geben muss (Weil et al. 1996). Es wurde gezeigt, dass die Regulationsproteine auf verschiedenen Ebenen der Kaskade eingreifen. So konnten Proteine beschrieben werden, die eine Aktivierung der Caspasen verhindern und andere, die deren proteolytische Aktivität inhibieren (Haunstetter und Izumo 1998).

In Überexpressionsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine aus der Bcl-2 Familie als wichtige Mediatoren sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken können. Zu den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie werden z.B. Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Bfl-1, BHRF-1 und Boo gezählt. Als proapoptotisch gelten unter anderem Bax, Bak, Bid, Bad, Mtd/Bok und Diva. Die antiapoptotischen Bcl-2 Mitglieder sind vor allem in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und verhindern dort die Freisetzung von Cytochrom-c und anderen intramitochondrialen Proteinen durch Inhibition von z.B. Bax oder von spannungsabhängigen Kanälen in der Membran. Bax wirkt z.B. durch die Freisetzung von Cytochrom-c und durch eine direkt zytotoxische Wirkung apoptoseinduzierend. Es ist jedoch auch eine direkte Aktivierung von Caspase 3 durch Proteine wie Bid beschrieben worden.

Neben der Gruppe der Bcl-2 Proteine sind auch noch andere regulatorische Proteine nachgewiesen worden. Der vor allem in Skelett- und Herzmuskelgewebe exprimierte *apoptosis repressor with caspase recruitment domain* (ARC), die IAP Familie und das FLIP-Protein regulieren sowohl die mitochondriale, als auch die rezeptorassoziierte Aktivierung durch Inhibition der Caspase 8 und der Cytochrom-c Freisetzung. Einen weiteren wichtigen Kontrollmechanismus stellt das Tumorsupressorgen p53 dar. Es reguliert den Zellzyklus

sowie die DNA Reparatur und veranlasst die Aktivierung der Apoptose (durch Induktion von Bax und Fas) in Abhängigkeit vom Grad der Zellschädigung (Haunstetter und Izumo 1998, Gottlieb 2003, Alberts et al. 2004, Lopez-Neblina et al. 2005).

## 2.2 Nachweis von Apoptose in Zellen

Für die Detektion von apoptotischen Zellen kann eine Vielzahl von verschiedenen Techniken mit unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität in Abhängigkeit vom Zelltyp, der Fixierung und der Fragestellung angewendet werden. Dabei werden grundsätzlich die Beurteilung der Morphologie, die Detektion der DNA-Fragmentation und der immunhistochemische Nachweis von apoptosespezifischen Proteinen bzw. deren Spaltprodukten unterschieden (Stadelmann und Lassmann 2000, van Heerde et al. 2000, Otsuki et al. 2003, Hunter et al. 2005).

**Tab. 2.1:** Gängige Techniken zur Detektion von apoptotischen Zellen (Stadelmann und Lassmann 2000, van Heerde et al. 2000)

### Morphologie

- Lichtmikroskopie (z.B. Hematoxylin, Methylgrün, Kernrot)
- Fluoreszenzmikroskopie (z.B. Propidiumjodid, Methylenblau)
- Durchflusszytometrie (z.B. Annexin V)
- Elektronenmikroskopie

### DNA Fragmentation

- TUNEL (*TdT mediated dUTP-biotin nick-end labeling*)
- ISEL (*in-situ end labelling*)
- Gelelektrophorese (*DNA laddering*)

### Nachweis von apoptoseassoziierten Proteinen

- Aktivierte Caspasen 3, 8, 9
- Caspasenspaltprodukte (z.B. Actin, Cytokeratin 18)
- Tissue Transglutaminase
- „*apoptotic-specific protein*“



## **2.3 Nekrose**

### **2.3.1 Definition**

Die Nekrose ist die durch ein exogenes oder endogenes schädliches Agens direkt ausgelöste Form des Zelltodes und stellt damit neben der Apoptose die zweite Form des natürlichen Untergangs von Zellen dar. Es kommt zur Denaturierung von Proteinen und dem enzymatischen Abbau ganzer Zellgruppen, gefolgt von einer Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe. Dabei werden drei verschiedene Formen von Nekrose unterschieden:

- die Koagulationsnekrose,
- die fibrinoide Nekrose und
- die Kolliquationsnekrose (Riede 2004, Zatloukal et al. 2004).

### **2.3.2 Morphologische und biochemische Veränderungen**

Die morphologischen Veränderungen der von der Nekrose betroffenen Zelle sind schon seit langem bekannt. Es kommt durch die Veränderung der physiologischen Umgebung oder eine direkte physikalische bzw. chemische Schädigung zu Defekten an der Zellmembran und daraus folgend zu einem Zusammenbruch der Ionenhomöostase. Daraus folgt das Einströmen von Flüssigkeit und extrazellulären Ionen in die Zelle, was zum Anschwellen führt. Auf eine reversible Schwellung der Zelle folgt ein irreversibles Ödem, das nun auch die Mitochondrien und andere Organellen betrifft. Der Zellkern ist initial jedoch nicht von der Schädigung betroffen, die Fragmentation der Erbsubstanz in kleine unregelmäßige Stücke findet erst nach der Zelllyse statt. Am Ende reißt die Membran ein und es kommt zum Austritt von lysosomalen Enzymen, was eine schwere Entzündungsreaktion nach sich zieht. Die ablaufenden Reaktionen sind, im Vergleich zur Apoptose, weder kaskadenförmig geordnet noch energieabhängig und laufen deshalb auch bei niedrigen Umgebungstemperaturen ab (Maisch 1999, Eisel et al. 2000, Riede 2004, Zatloukal et al. 2004).

**Tab. 2.2:** Vergleich von Nekrose und Apoptose (modifiziert nach Eisel et al. 2000)

<b>Nekrose</b>	<b>Apoptose</b>
<b>Morphologische Zeichen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Membranintegrität</li> <li>• Anschwellen der Mitochondrien und des Zytoplasmas zu Beginn</li> <li>• Zelllyse als Endstadium</li> <li>• Keine Vesikelbildung</li> <li>• Desintegration der Organellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Membran <i>blebbing</i>, aber kein Verlust der Membranintegrität</li> <li>• Chromatinkondensation im Kern</li> <li>• Beginnt mit Zellschrumpfung und endet mit Zellfragmentation</li> <li>• <i>Apoptotic bodies</i></li> </ul>
<b>Biochemische Zeichen</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verlust der Ionenhomöostase</li> <li>• Kein Energieverbrauch</li> <li>• Zufälliger DNA-Abbau</li> <li>• Postlytische DNA Fragmentation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hochregulierter Prozess mit kaskadenartigem Ablauf</li> <li>• Energieabhängig (ATP)</li> <li>• DNA Abbau an definierten Stellen</li> <li>• Prälytische DNA Fragmentation</li> <li>• Ausschüttung von mitochondrialen Enzymen in das Zytoplasma</li> <li>• Aktivierung der Caspasen-Kaskade</li> <li>• Veränderungen an der Zellmembran, jedoch ohne Integritätsverlust</li> </ul>
<b>Physiologische Bedeutung</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betrifft zusammenhängende Zellgruppen</li> <li>• Induktion durch unphysiologische Faktoren</li> <li>• Phagozytose durch Makrophagen</li> <li>• Signifikante Entzündungsreaktion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Betrifft nur einzelne Zellen</li> <li>• Wird durch physiologische Stimuli induziert (z.B. Hormone)</li> <li>• Abbau durch Makrophagen und andere phagozytierende Zellen</li> <li>• Keine Entzündungsreaktion</li> </ul>

## 2.4 Apoptose in Herzmuskelzellen

Obwohl die Apoptose in vielen anderen Geweben schon seit langem als ein grundlegendes Prinzip zur Elimination von überschüssigen, alten, geschädigten oder neoplastischen Zellen bekannt ist, wird ihre Rolle bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems erst seit wenigen Jahren erforscht (Haunstetter und Izumo 1998).

Im Myozyten folgt der Ablauf der Apoptosekaskade prinzipiell den gleichen Regeln, wie in allen anderen Zellgruppen auch. Die beteiligten Enzyme, Proteine und Regulationsmechanismen wurden auch in Herzmuskelgewebe nachgewiesen (Haunstetter und Izumo 1998, Saraste und Pulkki 2000, Dispersyn und Borgers 2001).

Schon Mitte der 70er Jahre wurde die Apoptose bei der Embryogenese des Herzens beschrieben. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Herzklappen, der Gefäße und der Vorhof- bzw. der Kammersepten. Dies führte aber erst etwa 20 Jahre später zu der Überlegung, dass eine Über- oder Unterregulierung der Apoptose z.B. bei der Entstehung von angeborenen Herzfehlern beteiligt sein könnte (Haunstätter und Izumo 1998). Fehlgesteuerte Apoptoseraten konnten z.B. für das Wolff-Parkinson-White Syndrom oder den kongenitalen AV-Block nachgewiesen werden (James 1994).

Mittlerweile wurde in einer Vielzahl von Studien ein Zusammenhang von Apoptose und der Entstehung einer ganzen Reihe von Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gezeigt (siehe Tab. 2.3).

**Tab. 2.3:** Beispiele für mit Apoptose assoziierte Erkrankungen des Herzkreislaufsystems

<b>Erkrankung</b>	<b>Quelle</b>
• Dilatative Kardiomyopathie	(Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997)
• Ischemische Kardiomyopathie	(Olivetti et al. 1997)
• Akuter Myokardinfarkt	(Saraste et al. 1997)
• Atherosklerose	(Isner et al. 1995)
• Myokarditis	(Bachmaier et al. 1997)
• Transplantatabstoßung	(Hinescu 2001)
• Präexzitationssyndrome	(James 1994)
• Kongenitaler AV-Block	(James 1994)

Die Apoptose spielt jedoch nicht nur bei Erkrankungen des Herzens eine Rolle, sondern ist auch für die Herzchirurgie an sich von Bedeutung. So konnten mehrere Studien auch eine Aktivierung der Apoptosekaskade durch den intraoperativen kardioplegischen Herzstillstand nachweisen (Aebert et al. 1997a, Aebert et al. 1997b, Brandes et al. 2003, Fischer et al. 2003, Hammel et al. 2003). Des weiteren konnte ein Zusammenhang von Apoptose und dem so genannten Reperfusionsschaden, wie er regelmäßig im Rahmen von Herzoperationen mit intermittierender Ischämie und Reperfusion auftritt, gezeigt werden (Eefting et al. 2004, Lopez-Neblina et al. 2005).

## 2.5 Myokardprotektion

Zahlreiche Eingriffe am Herzen sind nur unter Inkaufnahme von zeitweiser myokardialer Ischämie und anschließender Reperfusion möglich. Diese ist bedingt durch die Notwendigkeit eines stillstehenden Herzens z.B. in der Klappenchirurgie oder bei der Koronarrevaskularisation.

### 2.5.1 Definition und Geschichte

Der Begriff Myokardprotektion bezeichnet Strategien und Methoden zur Abschwächung oder zur Vermeidung von postischämischen, myokardialen Dysfunktionen, die während oder nach Herzoperationen auftreten können. Sie wird sowohl durch die Ischämie selbst, als auch durch den so genannten Reperfusionsschaden verursacht. Klinische Manifestationen der myokardialen Dysfunktion sind vor allem eine verminderte Auswurfleistung und Hypotension, aber auch Rhythmusstörungen. Der entstandene Schaden am Herzmuskel kann in eine reversible und in eine irreversible Schädigung unterteilt werden (Mentzer et al. 2003).

Der Gedanke der Myokardprotektion geht auf W. G. Bigelow aus Toronto zurück, der erstmals 1950 die Hypothermie als wirksame Technik zur Verminderung des myokardialen Sauerstoffbedarfes bei herzchirurgischen Eingriffen beschrieben hat (Bigelow et al. 1950). Er konnte mit seinen Versuchen als erster eine direkte Verbindung zwischen Körpertemperatur und Stoffwechselaktivität nachweisen (Fedak 1998). Melrose et al. veröffentlichten 1955 eine Studie über den Einsatz einer auf Blut basierenden, kaliumreichen Kardioplegielösung zur elektromechanischen Erzeugung von Herzstillständen bei normaler und reduzierter Körpertemperatur (Melrose et al. 1955). Die von ihm beschriebene Methode wurde in vielen herzchirurgischen Zentren in die klinische Praxis übernommen, jedoch erwies sich die von Melrose vorgeschlagene Zusammensetzung als toxisch für Myozyten, so dass die Myokardprotektion durch Kardioplegielösungen über mehrere Jahre nicht ernsthaft weiter verfolgt wurde (Mentzer et al. 2003, Stephenson 2003).

Erst Anfang der 70er Jahre wurde die Idee einer Kardioplegielösung durch Bretschneider et al. wieder aufgenommen. Er veröffentlichte 1975 eine Arbeit über eine kaliumarme und kalziumfreie Kardioplegielösung (Bretschneider et al. 1975). Auch durch Hearse et al. wurde Mitte der 70er Jahre eine neue Kardioplegielösung beschrieben. Sie basierte auf einer normalen Ringerlösung mit Zusätzen von Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid und Procain und wurde später als „St. Thomas Hospital Lösung“ in die klinische Praxis eingeführt (Hearse et

al. 1976, Braimbridge et al. 1977). Ende der 70er und Anfang der 80er Jahre wurden dann die ersten Kardioplegielösungen auf Grundlage von kaliumangereichertem Blut beschrieben und klinisch eingesetzt. Man ging dabei davon aus, dass Blut durch seine Oxygenierung und seine Pufferkapazität einer kristalloiden Lösung als Grundlage überlegen sei (Follette et al. 1978, Buckberg 1979).

Bis heute wird die Frage der optimalen Myokardprotektion, der Kardioplegielösung und der Applikationsart kontrovers diskutiert und ist nicht abschließend beantwortet (Mentzer et al. 2003).

### **2.5.2 Techniken zur Myokardprotektion**

Bei den meisten Eingriffen am Herzen muss die koordinierte Kontraktion des Myokards unterbrochen werden. Bei kurzen Operationen kann dies durch ein elektrisch induziertes Kammerflimmern geschehen, für längere Stillstandszeiten hat sich jedoch der kardioplegische Herzstillstand bewährt. Das Herz wird durch Abklemmen der Aorta von der Zirkulation getrennt und dann isoliert mit einer Kardioplegielösung perfundiert. Die Myokardprotektion wird dabei durch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Elektrolytlösung realisiert (Krukenkamp und Levitsky 1993, Cohen et al. 1999).

Es sind unzählige verschiedene Techniken und deren Kombinationen zur Protektion durch Kardioplegie beschrieben worden. Dabei gibt es starke Unterschiede in der Zusammensetzung der Lösungen und in der Art der Applikation, es sind ihnen jedoch allen einige wenige Grundprinzipien gemein:

- Kardioplegielösungen basieren entweder auf einer kristalloiden Elektrolytlösung oder auf dem Blut des Patienten, welches mit einem Elektrolytzusatz versetzt wird.
- Bei der Temperatur der Kardioplegielösung werden im allgemeinen 3 Bereiche unterschieden: a) hypotherm (4 - 12 °C), b) moderat hypotherm (28 - 30 °C) und c) normotherm (37 °C)
- antegrade Applikation über die Koronararterien, retrograd über das venöse System oder eine Kombination aus beidem
- kontinuierliche oder intermittierende Gabe (Cohen et al. 1999, Franke et al. 2003, Mentzer et al. 2003)

## 2.6 Herz-Lungen-Maschine

Um Operationen am nicht schlagenden Herzen durchführen zu können, musste zunächst eine Möglichkeit gefunden werden, die eine Versorgung der übrigen Organe mit ausreichend oxygeniertem Blut sicherstellen kann.

### 2.6.1 Definition und Geschichte

Die Herz-Lungen-Maschine ist als ein Gerät definiert, das als apparativer extrakorporaler Kreislauf vorübergehend die Herz- und Lungenfunktion zu übernehmen vermag (Reiche 1999).

Nachdem Lavoisier bereits Ende des 17. Jahrhunderts die Theorie über den Gasaustausch in der Lunge und damit den Zusammenhang von Sauerstoff und Leben aufgestellt hatte (Fou 1997), experimentierten ab Ende des 19. Jahrhunderts Physiologen mit der extrakorporalen Perfusion von Organen. Von Frey und Gruber entwickelten bereits 1885 eine Blutpumpe, die auch eine gleichzeitige Oxygenierung ermöglichte (von Frey und Gruber 1885). 1895 perfundierte Jacobi eine explantierte und künstlich beatmete Lunge mit Blut, um dieses mit Sauerstoff anzureichern (Jacobi 1895). Im Jahre 1916 entdeckte der Medizinstudent Jay McLean an der Johns Hopkins Universität mit dem Heparin das erste wirklich effektive gerinnungshemmende Mittel (McLean 1916). Erst dadurch wurde es möglich, die Gerinnung des Blutes durch den Kontakt mit künstlichen Oberflächen, wie z.B. in Schlauchsystemen und Pumpen, zu verhindern. Brukhonenko und Terebinsky bauten 1926 eine Maschine, die aus einer explantierten Tierlunge als Oxygenator und zwei mechanischen Pumpen bestand. Sie perfundierten mit diesem Apparat zuerst einzelne Organe, später sogar ganze Tiere (Brukhonenko und Terebinsky 1929, Stephenson 2003).

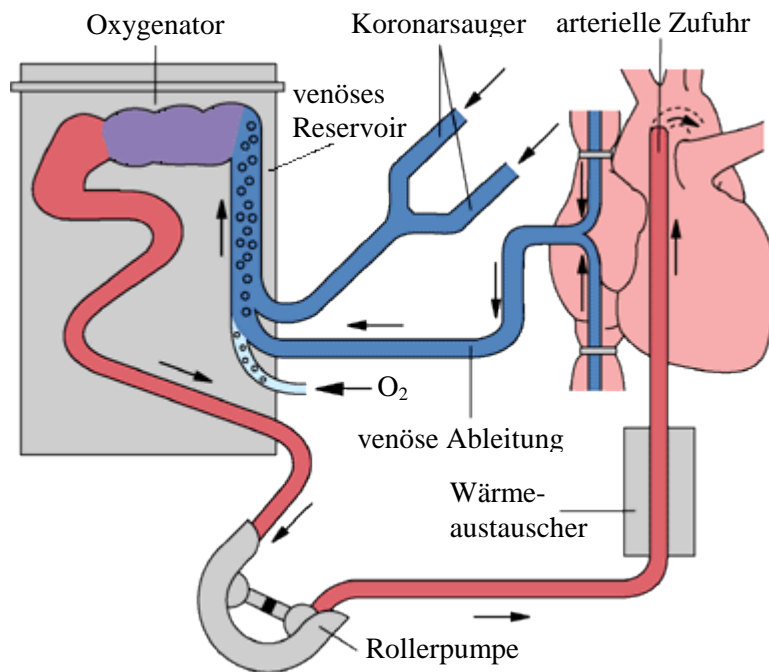
Mit diesen technischen Entwicklungen war der Grundstein für die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine gelegt, an der ab 1931 John H. Gibbon zusammen mit seiner Frau Mary arbeitete. Nach über 20 Jahren kontinuierlicher Entwicklung entstand in Zusammenarbeit mit IBM das so genannte Modell II. Nach erfolgreichen Versuchsreihen mit totalem kardiopulmonalen Bypass an Hunden führte John Gibbon am 6. Mai 1953 die weltweit erste erfolgreiche offene Herzoperation unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine durch (Gibbon 1954, Fou 1997, Fedak 1998, Cohn 2003, Pastuszko und Edie 2004).

Man schätzt, dass heute weltweit mindestens eine Millionen Eingriffe unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine pro Jahr durchgeführt werden (Stephenson 2003), davon allein über 70 000 in Deutschland (Kalmar und Irrgang 1999).

### 2.6.2 Aufbau der Herz-Lungen-Maschine

Seit Gibbon besteht jede Herz-Lungen-Maschine aus den gleichen 4 Basiskomponenten:

1. einem venösen Reservoir,
2. einem Oxygenator,
3. einer arteriellen Pumpe und
4. einem Wärmetauscher für das extrakorporale Blut (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3:** Prinzipieller Aufbau einer Herz-Lungen-Maschine (modifiziert nach Reiche 1999)

Während des kardiopulmonalen Bypasses drainiert das venöse Blut normalerweise über Kanülen aus der oberen und/oder unteren Hohlvene bzw. dem rechten Vorhof durch die Schwerkraft in das venöse Reservoir der Herz-Lungen-Maschine. Das Blut wird dann von dort durch den Membranoxygenator und den Wärmetauscher wieder in das arterielle Gefäßsystem, im allgemeinen in die Aorta ascendens des Patienten gepumpt. Darüber hinaus verfügen moderne Geräte über eine Vielzahl an zusätzlichen Funktionen wie z. B. verschiedene Filter, eine Luftfalle in der arteriellen Linie, Saugsysteme, die das Blut aus dem

Operationsfeld oder den Herzkammern auffangen und in das venöse Reservoir leiten, so genannte *cell saver* Systeme, Sensoren zum Monitoring von Drücken, Temperatur, Sauerstoffsättigung, Blutgasen, pH, usw. und einen separaten Kreislauf zur Kardioplegiegabe (Hessel und Edmunds 2003).



### 3. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den potentielle Einfluss der verschiedenen in der klinischen Praxis verwendeten Kardioplegieverfahren auf die Induktion apoptotischer Vorgänge am Myokard und deren Verlauf nach prolongierter Ischämie von 120 min zu verifizieren und mit der myokardialen Funktionseinschränkung zu korrelieren. Nur wenige Studien haben sich mit dem Einfluss von künstlichem Herzstillstand und Kardioplegielösungen auf die Kardiomyozyten befasst (Yeh et al. 2003). Bis heute gibt es nur einige wenige Veröffentlichungen über die Apoptoseinduktion und keine einzige vergleichende Arbeit über den Einfluss der verschiedenen Kardioplegieverfahren auf die Apoptoserate (Anselmi et al. 2004).

Grundvoraussetzung ist die Etablierung eines experimentellen Großtiermodells mit Einsatz der Herz-Lungen-Maschine und der Möglichkeit der Applikation von Kardioplegielösung über die Aortenwurzel und den *Sinus coronarius*.

Es soll das Ausmaß der Apoptose im Myokard an Hand von zwei histologischen Markern an Semidünnschnitten bestimmt werden. Erstens die morphometrische Bestimmung der Expressionsrate des Proteins Tissue Transglutaminase und zweitens der Grad der DNA-Fragmentierung in den Zellkernen durch den Nachweis von Doppelstrangbrüchen mit der so genannten ISEL-Methode. Außerdem soll der zeitliche Verlauf der Apoptoserate im Myokard nach kardioplegischem Herzstillstand beschrieben werden. Anschließend wird der Grad der bestimmten Apoptoserate mit den Hämodynamikparametern korreliert, um Hinweise über den Einfluss der Apoptose auf die myokardiale Funktion zu gewinnen.

Die Ermittlung der Auswirkungen der Kardioplegie auf die Apoptoserate und deren Folgen für die Leistungsfähigkeit des Herzens ist für eine eventuelle pharmakologische Beeinflussung hoch interessant. Es sind bereits potente apoptosehemmende Medikamente beschrieben worden, die ohne größeren Aufwand zu einer verbesserten postoperativen Herzleistung beitragen könnten (Reed 2001, Eefting et al. 2004).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich gegebenenfalls Schlüsse zur Verbesserung der Myokardprotektion nach prolongierter Ischämie bei Herzoperationen ableiten.

## 4. Methodik

### 4.1 Tierversuchsgenehmigung

Der Antrag auf Genehmigung eines Tierversuches durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. habil. Th. Wahlers und Herrn Dr. med. H. Brandes wurde am 22.5.2001 unter der Reg.-Nr. 02-06/01 vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz als zuständige Behörde genehmigt (siehe Anhang S. 93). Sämtliche Tierversuche wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes im Institut für Versuchstierkunde (Leiter: Dr. med. vet. H. Schubert) der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

### 4.2 Versuchsablauf

Für die Versuche wurden 21 weibliche Hausschweine im Alter von 11 bis 15 Wochen und einem Körpergewicht von  $24,4 \pm 2,3$  kg verwendet. Diese sind in zwei Versuchsgruppen (1,2) mit  $n = 8$  und jeweils einer unterschiedlichen Kardioplegielösung und Applikationsform zur Myokardprotektion eingeteilt und einer Kontrollgruppe (3) mit  $n = 5$  gegenübergestellt worden.

Gruppe 1 erhielt eine retrograde Applikation von Blutkardioplegie nach Buckberg (Buckberg 1979) und Gruppe 2 eine intermittierende, antegrade Applikation von „warmer“ Blutkardioplegielösung (IAWBC) nach Calafiore (Calafiore et al. 1994, Calafiore et al. 1995). Bei den Tieren in der Kontrollgruppe 3 wurde nur ein kardiopulmonaler Bypass (CPB) etabliert, jedoch ohne einen künstlichen Herzstillstand zu induzieren.

Die in Gruppe 1 verwendete Kardioplegielösung nach Buckberg (Zusammensetzung siehe Tab. 4.1) wurde mit körpereigenem Blut im Verhältnis von 4 : 1 (Blut : Buckberglösung) gemischt und auf 4° C gekühlt. Die resultierende Kaliumkonzentration in der fertigen Blutkardioplegielösung betrug ca. 20 - 25 mval/l. Der Zusatz zur Blutkardioplegie (Buckberglösung) wurde von der Klinikumsapotheke der FSU Jena hergestellt.

Bei der in Gruppe 2 verwendeten, von Calafiore et al. beschriebenen, IAWBC wurde dem aus dem Oxygenator der Herz-Lungen Maschine entnommenen Blut eine Mischung aus 30 ml Kaliumchloridlösung (2mmol/ml  $K^+$ , 2mmol/ml  $Cl^-$ ) (Kaliumchlorid 14,90 % B. Braun; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und 4 ml Magnesiumsulfat (Mg%-Sulfat

50%; B. Braun) mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Perfusor; B. Braun) zugesetzt und als Kardioplegielösung verwendet (Applikationsschema siehe S. 34).

**Tab. 4.1:** Zusammensetzung der Kardioplegielösung nach Buckberg

Kaliumchlorid	10 mg
Natriumhydrogenphosphat dihydrat	62,5 mg
Natriumchlorid	618,6 mg
Zitronensäure	75 mg
Natriumcitrat dihydrat	657,6 mg
Glucose monohydrat	15,7 mg
Aqua destillata	ad 375 ml

Jedes Schwein wurde für die Narkoseeinleitung mit einer intramuskulären Injektion von 20 mg/kg\*KG Ketamin (Ketamin 10 %; Atarost GmbH, Twistringen, Deutschland), 150 U Hylase (Hylase-Dessau; PharmaDessau GmbH, Dessau, Deutschland) und 0,04 mg/kg\*KG Atropin (Atropin-Sulfat B. Braun 0,5 g; B. Braun) prämediziert. Die Narkose wurde dann mit einer intravenösen Injektion von 2 mg/kg\*KG Propofol (Disoprivan 2 % Emulsion; AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland) eingeleitet und durch eine kontinuierliche Gabe (Combimat 2000; Doering GmbH, München, Deutschland) von 10 - 16  $\mu\text{g/kg*KG*min}^{-1}$  Midazolam (Midazolam ratiopharm 15 mg/3 ml; Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 0,2 - 0,4  $\mu\text{g/kg*KG*min}^{-1}$  Fentanyl (Fentanyl-Janssen; Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und 6 - 10  $\mu\text{g/kg*KG*min}^{-1}$  Pancuronium (Pancuronium duplex; CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) über eine Ohrvene aufrechterhalten. Die Tiere wurden mit einem Endotrachealtubus intubiert und mit einem Beatmungsgerät (Servo Ventilator 900 C; Siemens AG Medical Solutions, Erlangen, Deutschland) druckkontrolliert beatmet (Tab. 4.2).

**Tab. 4.2:** Beatmungsparameter während der Versuche

Atemfrequenz	14 - 18 $\text{*min}^{-1}$
Inspiration : Expiration	1 : 1,3
FiO <sub>2</sub>	50 %
Spitzendruck	16 - 22 mbar
PEEP	5 mbar

Intraoperativ wurde die *V. jugularis interna* beidseits und die *A. carotis communis* auf der rechten Halsseite freipräpariert. Die rechte *A. carotis* wurde punktiert und eine Kanüle eingeführt, über die dann kontinuierlich eine invasive arterielle Blutdruckmessung erfolgte.

Über diese Kanüle wurden auch die Proben für die arterielle Blutgasanalyse gewonnen. Nach Punktion wurde in die rechte *V. jugularis interna* in Seldingertechnik eine Katheterschleuse (Intro-Flex 8 F, Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA) eingebracht, über die dann ein Swan-Ganz Katheter (CCombo V 7,5 F; Edwards Lifesciences) in die *A. pulmonalis* eingeschwenkt wurde. In die linke *V. jugularis interna* wurde, ebenfalls in Seldingertechnik, ein dreilumiger zentraler Venenkatheter (Certofix Trio SB 730 7,0 F; B. Braun) zur Volumensubstitution und zur kontinuierlichen Narkoseerhaltung eingelegt.

Bei den Versuchstieren wurde im gesamten Versuchsablauf ein EKG nach Einthoven abgeleitet und, nach Einlage der Katheter, der arterielle Blutdruck, der zentralvenöse Druck (ZVD) sowie der pulmonalarterielle Druck (PAP) gemessen (Virida 24 C; Hewlett-Packard, Andover, MA, USA). Das Herz-Zeit-Volumen wurde mit Hilfe der Thermodilutionsmethode über den Swan-Ganz Katheter berechnet (Vigilance; Baxter Healthcare Corp., Irvine, CA, USA). Außerdem wurde bei jedem Tier die Blase katheterisiert und eine Temperatursonde (Virida 24 C; Hewlett-Packard) in das Rektum eingeführt.

Bei den Schweinen wurde der Thorax in Seitenlage rechts lateral in einem Zwischenrippenraum eröffnet und nach sternumnaher Durchtrennung von zwei Rippen ein Thoraxspreitzer eingeführt. Das Perikard wurde eröffnet und durch eine Hochnaht offen gehalten. Danach erfolgte die Gabe von 600 U/kg\*KG Heparin (Liquemin N 25000; Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Nun wurde die *Aorta* freipräpariert und etwas distal der Aortenklappenebene eine kombinierte 7 F Kardioplegie- und Ventkanüle (Medtronic Inc., Minneapolis, MN, USA) eingeführt. Die Kardioplegie- und Ventkanüle ermöglicht sowohl die antegrade Gabe von Kardioplegielösung, als auch das Absaugen („venting“) von überschüssigem Blut und/oder von Kardioplegielösung aus den Herzkammern. Weiter distal wurde dann nach einer Stichinzision eine arterielle 24 F Kanüle (Jostra AG, Hirrlingen, Deutschland) platziert. Bei beiden Kanülen wurde jeweils eine Tabaksbeutelnaht vorgelegt und diese dann mit einem *Tourniquet* angezogen.

Nun wurden als Ausgangswerte eine arterielle Blutprobe (gemessen wurden:  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $SO_2$ , pH, *base excess*, Bikarbonat, Hämoglobin, Hämatokrit, Kalium, Natrium, Glukose and Laktat [ABL 715; Radiometer Medical A/S, Brønshøj, Dänemark]) entnommen, die Hämodynamik- ( $P_{sys}$ ,  $P_{dias}$ , MAP, ZVD, HZV, PAP, HF) und Beatmungsparameter sowie die Rektaltemperatur protokolliert.

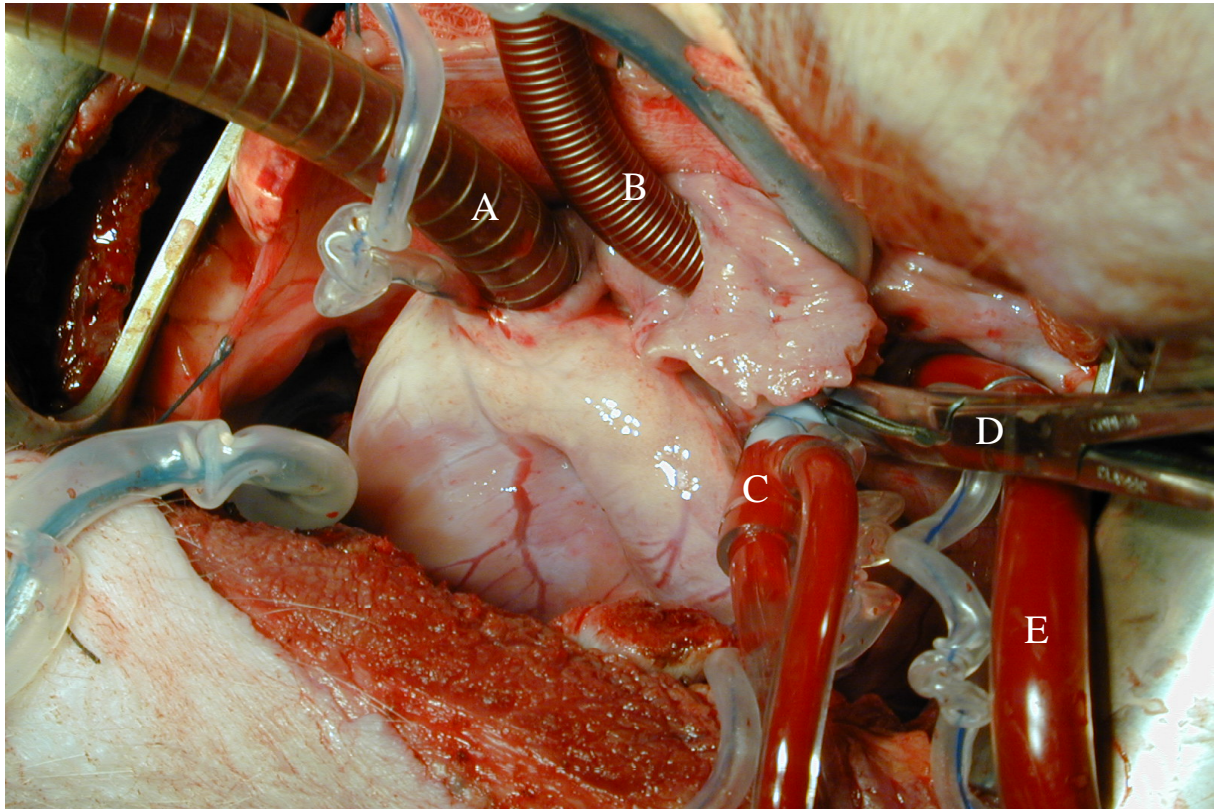
Dieser Versuchsablauf wurde bei allen Versuchsgruppen standardisiert durchgeführt. Für jede der Gruppen folgte nun ein modifizierter, auf die unterschiedliche Kardioplegieapplikation abgestimmter Ablauf.

Für die retrograde Blutkardioplegie (Gruppe 1) wurde zusätzlich der linke Thorax in einem Zwischenrippenraum eröffnet. Nach Einführen eines Spreitzers wurde nun die *V. azygos* freipräpariert und dann ligiert, da diese beim Schwein nicht wie beim Menschen in die *V. cava superior*, sondern in den *Sinus coronarius* einmündet. Eine nicht ligierte *V. azygos* hätte zu einem unkalkulierbaren Verlust von Kardioplegielösung aus dem *Sinus coronarius* in die *V. azygos* geführt und in einer nicht genügenden Myokardprotektion resultiert. Nun wurden die obere und die untere Hohlvene mit jeweils einer Bandligatur angeschlossen. Der rechte Vorhof wurde eröffnet und eine venöse 28 F Kanüle (Terumo Cardiovascular Systems Corp., Ann Arbor, MI, USA) in die untere und über eine Inszision im rechten Herzohr eine 26 F Kanüle in die obere Hohlvene eingeführt. Nach Anziehen der Ligaturen wurde somit ein totaler Bypass ermöglicht. Dieser ist nötig, um den Vorhof, nach großzügiger Eröffnung, vollständig blutleer zu saugen. Nur so ist es möglich, die retrograde 15 F Kardioplegiekanüle (DLP Multi-Port Tip RCSP Cannula 94935, Medtronic Inc.) unter direkter Sicht in den *Sinus coronarius* einzuführen. Alle Kanülen wurden dann über ein Schlauchsystem (Jostra) mit einer Herz-Lungen Maschine (CAPS; Stöckert Instrumente GmbH, München, Deutschland; 550 Bio Console; Medtronic Bio-Medicus Inc., Eden Prairie, MN, USA) und dem daran angeschlossenen Membranoxygenator (Jostra) verbunden.

Bei Gruppe 2 mit der antegraden Applikation (IAWBC), wurde mit einem Stichskalpell der rechte Vorhof eröffnet, eine venöse 28 F Saugkanüle (Terumo) im rechten Atrium platziert und mit einer Tabaksbeutelnaht gesichert. Diese Kanülen wurden nun auch entsprechend an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen.

Die Herz-Lungen-Maschine wurde in beiden Gruppen mit 1000 ml Ringer-Lactat Lösung (Ringer-Lactat; B. Braun), 250 ml Hydroxyethylstärke 6 % (HAES-steril 6 %; B. Braun), 50 ml Mannitol 15 % (Mannitol 15; Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland), 50 ml Aprotinin (Trasylol 0.5; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland), 5000 U Heparin (Liquemin N 25000; Hoffmann-La Roche) und 20 ml  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  (Natriumhydrogencarbonat 8.4 % B. Braun; B. Braun) vorgefüllt. Die Flussrate der Herz-Lungen-Maschine hat  $2,4 \text{ l/min/m}^2$  Körperoberfläche betragen. Die Berechnung der Körperoberfläche (KOF) in  $\text{m}^2$  beim Schwein erfolgte durch die Formel nach Mack:

$$\text{KOF} = K \cdot \sqrt[3]{\text{KG}^2} \quad (K = \text{Schweinekonstante } 0,1; \text{KG} = \text{Körpergewicht in kg})$$



Legende:

Venöse Kanüle in der unteren (A) und oberen (B) Hohlvene, Kardioplegie- und Ventkanüle (C), Aortenklemme (D) und arterielle Kanüle (E)

**Abb. 4.1:** Op-situs während der EKZ (Herz bicaval kanüliert)

Nach Klemmung der Aorta wurde durch die Gabe der Kardioplegielösung der künstliche Herzstillstand induziert. Die Lösungen wurden druckkontrolliert mit ca. 50 - 70 mmHg über die Kardioplegiekanüle in die Aortenwurzel bzw. den *Sinus coronarius* infundiert, was etwa einer Flussrate von 200 ml/min entspricht.

Die Mischung aus Buckberglösung und Blut wurde initial für 5 min verabreicht, danach erfolgte alle 20 min nochmals für 2 min eine Kardioplegiegabe.

Bei der IAWBC erfolgte die Gabe der Kaliumchlorid-Magnesiumsulfat-Lösung über die Spritzenpumpe nach einem speziellem Schema:

- Initialdosis: Bolusgabe 2 ml; dann 3 min bei einer Flussrate von 150 ml/h
- Nach 20 min: 2 min mit 120 ml/h
- Nach 40 min: 2 min mit 90 ml/h
- Nach 60 min: 3 min mit 60 ml/h
- Nach 80 min: 3 min mit 40 ml/h
- Nach 100 min: 4 min mit 40 ml/h

Die Lösung wurde mit Blut aus der HLM gemischt und bei einer Flussrate von ca. 200 ml/min infundiert.

Bei allen Versuchstieren betrug die Stillstandszeit des Herzens 120 min. Nach dieser Stillstandszeit wurde die Aortenklemme entfernt und die Herzen mit warmem, systemischen Blut für 45 min reperfundiert und schrittweise vom kardiopulmonalen Bypass entwöhnt. Bei in der Reperfusionphase auftretendem Kammerflimmern wurde mit bis zu 30 J defibrilliert. Bei stabiler Hämodynamik wurde der kardiopulmonale Bypass beendet, alle Kanülen entfernt und sowohl der Vorhof, als auch die Aorta übernäht. Darauf folgte eine sechsstündige Nachbeobachtungszeit.

Während der Nachbeobachtungszeit wurden stündlich arterielle Blutproben entnommen, sowie die Hämodynamikparameter, die Urinausscheidung und die rektale Temperatur protokolliert. Nach Bedarf wurde Volumen in Form von Vollelektrolytinfusionen gegeben und die Beatmungsparameter nach den Ergebnissen der Blutgasanalysen angepasst. Das im Schlauchsystem der Herz-Lungen Maschine verbliebene Blut wurde gefiltert und als Infusion dem Tier wieder verabreicht, auf Fremdblut wurde bei allen Versuchen verzichtet.

Bei jedem Tier wurden zu 3 Zeitpunkten (vor und nach der Ischämiezeit, sowie nach den 6 h der Nachbeobachtungszeit) jeweils am rechten Vorhof, sowie an der rechten und linken Kammer des Herzens Myokardbiopsien entnommen (Abb. 4.2).

Nach Ende der Beobachtungszeit und der letzten Biopsieentnahme wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet.

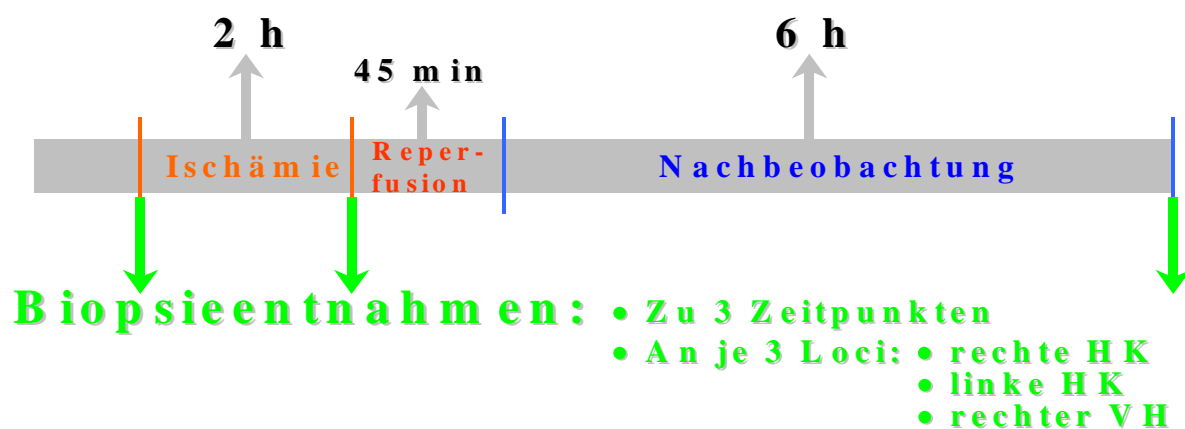


Abb. 4.2: Zeitlicher Ablauf des Versuches

Während der Versuche verstarben insgesamt 4 Versuchstiere an einem nicht genügend protektioniertem Herzen bei retrograder Kardioplegiegabe, darauf hin wurde die *V. azygos* aus den weiter oben genannten Gründen ligiert. Ein weiteres Tier der Gruppe 1 verstarb an einer nicht stillbaren Blutung durch eine eingerissene Pulmonalarterie. Außer den Genannten verstarb kein weiteres Tier der 3 Gruppen während der Versuche. Die in der Gruppe 1 ausgefallenen 4 Tiere wurden durch neue Tiere ersetzt und die Versuche nachgeholt, da der Tod der Tiere auf einen methodischen bzw. chirurgischen Fehler zurück zu führen war und damit die Auswertung nicht verfälscht werden konnte.

### 4.3 Immunhistochemie

#### 4.3.1 Einbetten und Schneiden der Biopsien

Für die immunhistochemische Aufarbeitung wurden die Myokardbiopsien direkt nach der Entnahme in 5 % Paraformaldehydlösung (in 0,1 M PBS [*phosphate buffert saline*]) für 24 h fixiert. Danach wurden die Proben in einer ansteigenden Lösungsreihe mit Ethanol entwässert, in das Kunstharz EPON (Fluka, Buchs, Schweiz) eingebettet und nach zehntägiger Trocknungszeit mit einem Mikrotom (Reichert Ultracut E; Reichert & Jung, Wien, Österreich) in 1 µm Semidünnschnittserien geschnitten. Das Kunstharz wurde danach wieder entfernt, in dem die Schnitte für 3 min in 10 % Natriummethylat, für 2 min in einer Mischung aus Methanol und Benzol (1 : 2) und abschließend zweimal für jeweils 2 min in Aceton gewaschen wurden.

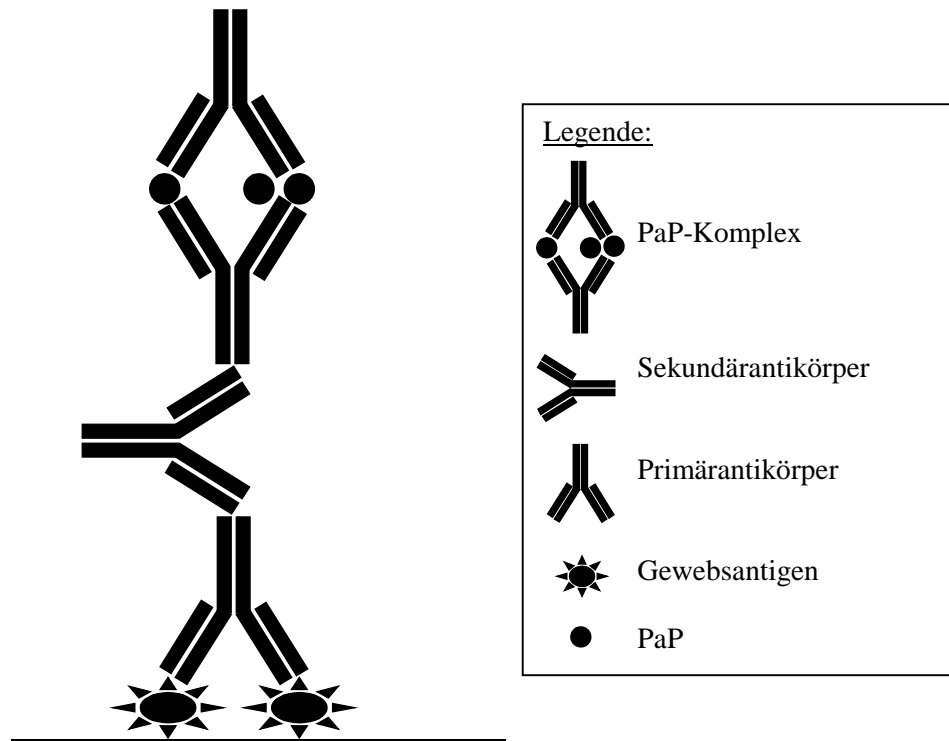
#### 4.3.2 *In-situ end labeling* (ISEL) von 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) durch terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT)

Die wahrscheinlich am häufigsten benutzte Methode zur Bestimmung der Apoptoseinduktion ist der Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das so genannte *terminal transferase-mediated dUTP nick-end labeling* (TUNEL) oder Abwandlungen davon, wie die bei dieser Arbeit verwendete ISEL-Methode. Diese Technik basiert darauf, dass an die apoptosetypischen freien 3'-Enden der DNA-Strangbrüche durch das Enzym TdT markierte Nukleotide angehängt werden, die dann wiederum durch Antikörper und eine Chromogenreaktion sichtbar gemacht werden können. Bei der hier angewendeten, von Aschof et al. entwickelten, ISEL-Methode wurde 5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU) als Nukleotid



verwendet, welches bis zu 70 bp große Komplexe ausbildet, die als ein prominentes Antigen wirken und so eine hohes Auflösungssignal in Semidünnschnitten ermöglichen (Aschoff et al. 1996, Stadelmann und Lassmann 2000).

Nach Waschen in 66 mM PBS wurden die Schnitte mit jeweils 25 µl TdT-Reaction-Mix (Roche, Mannheim, Deutschland) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Der TdT-Reaction-Mix bestand aus 4 µl (100 U) TdT, 8 µl TdT Reaktionspuffer, 3 µl CoCl<sub>2</sub> (25 mM) in 400 µl 66 mM PBS, dem noch 2 µl BrdU (2,5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA) zugesetzt wurde. Die Schnitte wurden danach für 10 min in 66 mM PBS gewaschen und für 30 min mit 20 % *normal goat serum* (Sigma) präinkubiert. Um das inkorporierte BrdU zu markieren, wurde mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen BrdU (Progen, Heidelberg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1 : 1000 in 66 mM PBS bei 4 °C für 12 h inkubiert. Zur Visualisierung folgte eine Peroxidase-Anti-Peroxidase (PaP) Färbung des antikörpermarkierten BrdU (Abb.4.3). Dafür wurde zuerst für 30 min bei 20 °C mit *anti-mouse IgG in goat* (Sigma) in einer Verdünnung von 1 : 100 und dann für weitere 30 min bei 20 °C mit monoklonaler Maus PaP (Sigma) in einer Verdünnung von 1 : 100 inkubiert.



**Abb 4.3:** Prinzip der PaP-Methode (modifiziert nach Bourne 1997)

#### 4.3.3 Färbung mit anti-Tissue-Transglutaminase (anti-tTG)

Konsekutive Schnitte wurden mit einem polyklonalen Ziegenantikörper gegen Tissue Transglutaminase (anti type II transglutaminase; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA) in einer Verdünnung von 1 : 1000 mit 1 % *normal rabbit serum* (Sigma) in 66 mM PBS für 24 h bei 4 °C inkubiert. Für die Visualisierung der Schnitte mit PaP wurden sie bei 20 °C für 1 h mit *anti-goat IgG in rabbit* (Sigma) bei einer Verdünnung von 1 : 100 in 66 mM PBS und dann für eine weitere Stunde bei 20 °C mit monoklonaler Ziegen PaP (Sigma) 1 : 100 in 66 mM PBS inkubiert.

Nach jeder Inkubation mit Antikörpern wurden die Schnitte zweimal bei 20 °C für 10 min in 66 mM PBS gewaschen. Die Immunoprecipitate wurden sichtbar gemacht, indem die Schnitte für 5 - 10 min in Diaminobenzidin (Sigma Fast 3,3 Diaminobenzidine tablets sets; Sigma) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 66 mM PBS bei Raumtemperatur gewaschen wurden.

Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen ohne TdT bzw. ohne Antikörper gegen tTG als Qualitätsprüfung mitgeführt.

Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert, in Xylol gereinigt und für das Mikroskopieren mit Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) abgedeckt.

Die anti-tTG Färbung wurde auf dem nächsten konsekutiven Semidünnschnitt durchgeführt, der dem Schnitt für den Nachweis der DNA-Strangbrüche (ISEL) folgte.

#### 4.4 Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskopie und Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit einem Differential-Interferenz-Kontrast Mikroskop (Bx50; Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 400 x Vergrößerung mikroskopiert. Für die weitere Bearbeitung wurden von den Folgeschnitten mit der ISEL und der tTG-Färbung pro Schnitt 3 identische Ausschnitte mit einer Digitalkamera fotografiert (DP10; Olympus), um eine genügend große und damit repräsentative Zellzahl zu erreichen. Durch UV-Licht der Wellenlänge 440 nm (blau) wurde zusätzlich die Autofluoreszenz der Myozyten, wahrscheinlich der Myofibrillen (Lotze et al. 2001), angeregt, um eine präzise Identifikation der Zellgrenzen zu ermöglichen und dann ebenfalls fotografiert.

Diese Fotos wurden mit dem Programm Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) jeweils von zwei unterschiedlichen Untersuchern (Frau Dipl.-Biol. H. Beinhauer und L. Becker) doppelblind am Computer bearbeitet und ausgewertet.

Die Anfärbung von tTG ist diffus im gesamten Gewebe verteilt und kann nicht einfach ausgezählt werden, daher wurde als Maß für die Expression der tTG der prozentuale Anteil an tTG-positiv gefärbter Fläche an der Gesamtmyozytenfläche morphometrisch bestimmt. Dazu wird eine Farbkodierung auf die „Transglutaminase-Bilder“ im Programm Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems) angewendet und anschließend mit einem in der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der FSU Jena geschriebenen Programm der prozentuale Anteil der tTG-positiven Fläche an der Gesamtfläche der Herzmuskelzellen errechnet.

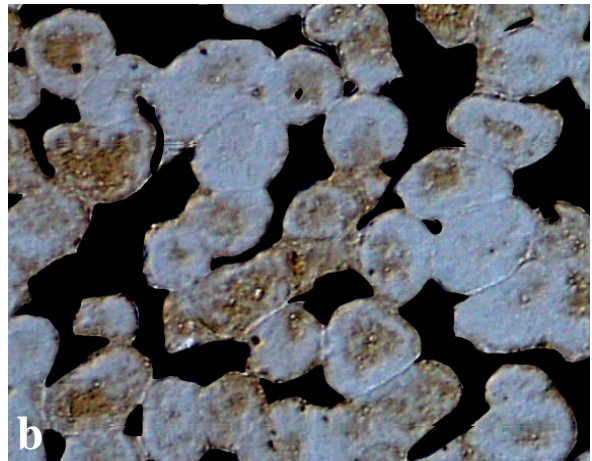
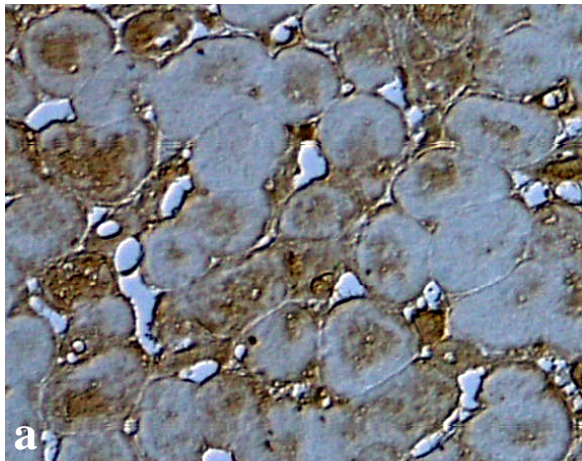
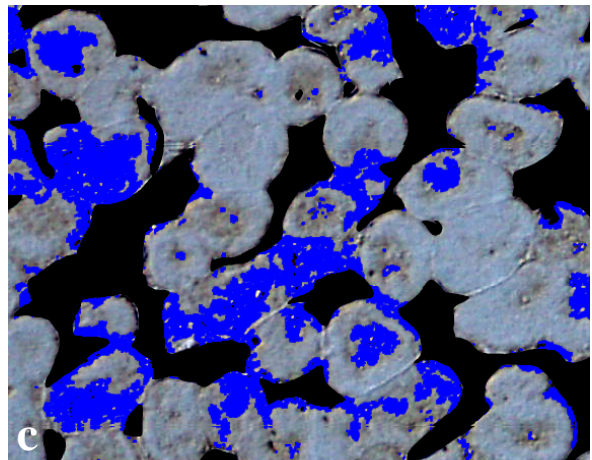


Abb. a: unbearbeitete Aufnahme eines mit anti-tTG gefärbten Schnittes

Abb. b: alle Zellzwischenräume und alle nicht Myozyten wurden als „schwarz“ kodiert

Abb. c: Farbkodierung der braungefärbten, tTG-positiven Zellabschnitte als „blau“ (c)



**Abb. 4.4:** Bearbeitung der immunhistochemisch mit anti-tTG gefärbten Schnitte (Vergrößerung 400x)

Alle Bildabschnitte, die nicht Herzmuskelzellen repräsentieren, z.B. Interzellularräume oder andere Zell- oder Gewebetypen, wurden markiert und als „schwarz“ (rot/grün/blau = 0/0/0) kodiert. Anschließend wurden positiv gefärbte Bereiche innerhalb der Herzmuskelzellen markiert und durch den Farbton „blau“ (rot/grün/blau = 0/0/255) farbkodiert (Abb. 4.4). Das in der Abteilung geschriebene Programm ermittelte die prozentuale Verteilung der Pixel „blau“, „schwarz“ und „Rest“. Als „Rest“ wurden die Flächen innerhalb der Myozyten bezeichnet, die tTG-negativ sind. Aus dieser prozentualen Verteilung der farbkodierten

Flächen nach Subtraktion der Prozentzahl („schwarz“), die keine Herzmuskelzellen darstellt, ließ sich der Anteil tTG-positiver Bereiche an der Gesamtfläche aller Herzmuskelzellen errechnen.

Bei den mit TdT (ISEL) gefärbten Schnitten wurde der prozentuale Anteil der für DNA-Doppelstrangbrüche angefärbten Zellkerne bezogen auf die gezählte Gesamtzellzahl berechnet.

Dafür wurden die Zellgrenzen in der UV-Aufnahme markiert, die Zellen gezählt und dann in die mit der ISEL-Methode gefärbten Aufnahme kopiert. Nun war es möglich zu unterscheiden, ob die ISEL-positiven Kerne in den Myozyten liegen, oder sich außerhalb der Zellen befinden und damit als falsch positiv zu betrachten sind (s. Ergebnisse Abb. 5.1).

#### **4.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 11 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Für fortlaufende Daten wurden die Mittelwerte  $\pm 1$  Standardabweichung und für absolute Daten die relativen Häufigkeiten in Prozent angegeben.

Unterschiede mit einem  $p \leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die von den beiden Untersuchern doppelblind ermittelten Werte wurden als Mittelwerte zusammengefasst und dann weiter ausgewertet. Zum Vergleich der 3 Gruppen untereinander wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für den Zeitverlauf innerhalb der Gruppen kam der Vorzeichen-Test für verbundene Stichproben zum Einsatz. Die Korrelation der beiden Marker untereinander wurde mit der Methode nach Spearman-Rho für bivariate Korrelationen berechnet.

## 5. Ergebnisse

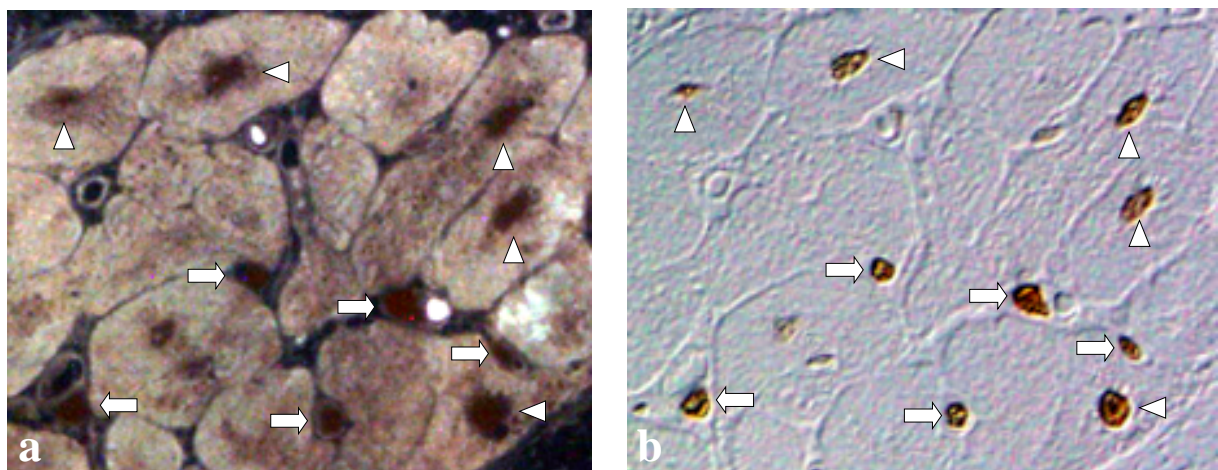
### 5.1 Histologische Auswertung

In den als Negativproben mitgeführten Kontrollen ohne TdT bzw. ohne Antikörper gegen tTG konnten keine Immunreaktionen beobachtet werden.

Weder für die Fragmentationsrate der DNA, noch für die tTG-Expression konnten Unterschiede zwischen den 3 Lokalisationen (rechter Vorhof, rechter und linker Ventrikel) gefunden werden, so dass die Werte zu jeweils einem Mittelwert pro Zeitpunkt zusammengefasst wurden.

#### 5.1.1 Bestimmung der DNA-Fragmentation mit der ISEL-Methode

Die für apoptotische Zellen typischen Doppelstrangbrüche der DNA wurden in dieser Arbeit mit der ISEL-Methode nach Aschoff et al. nachgewiesen (Aschoff et al. 1996). Dabei zeigten sich bei der mikroskopischen Auswertung in einem Teil der untersuchten Herzmuskelzellen Nachweise von DNA-Fragmentationen in den Zellkernen. Im Mikroskop imponiert dieser Nachweis als eine spezifisch im Zellkern lokalisierte dunkelbraune Anfärbung.



**Abb. 5.1:** Autofluoreszenz der Myofibrillen bei 440 nm (Abb. a), Nachweis von DNA-Fragmentation durch ISEL (Abb. b) (Pfeilspitzen: ISEL-positiver Myozytenkern, Pfeil: extrazellulärer falsch positiver Nachweis z.B. in Makrophagen; Vergrößerung 400x)

Es waren jedoch nicht nur in den Myozyten gelegene Nachweise, sondern auch deutlich angefärbte Kerne im Interstitium außerhalb der Herzmuskelzellen zu erkennen. Hierbei handelte es sich am ehesten um die falsch positive Anfärbung von eingewanderten Entzündungszellen, wie z.B. Makrophagen (van Heerde et al. 2000). Durch den Vergleich mit der durch UV-Licht (440 nm) angeregten Autofluoreszenz der Myofibrillen, in der die Myozytengrenzen eindeutig zu erkennen waren, konnten die angefärbten Entzündungszellen durch ihre extrazelluläre Lage identifiziert und in der Auswertung als falsch positiv gewertet werden (Abb. 5.1).

#### 5.1.1.1 Auszählparameter

In den zu jedem der 3 Zeitpunkte entnommenen Biopsien aus dem rechten Vorhof, sowie der rechten und der linken Kammer wurden insgesamt im Durchschnitt je Zeitpunkt in Gruppe 1  $432 \pm 178$  vs.  $665 \pm 263$  in Gruppe 2 vs.  $530 \pm 218$  Zellen in Gruppe 3 gezählt.

#### 5.1.1.2 DNA-Fragmentationsrate

Bei der mit der ISEL-Methode bestimmten DNA-Fragmentationsrate zeigten sich innerhalb der 3 Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten. Zwischen den Versuchsgruppen gab es nur zum Zeitpunkt 1 einen nachweisbaren Unterschied bei den Gruppen 1 und 2 mit  $p \leq 0,001$  und den Gruppen 1 und 3 mit  $p = 0,03$ .

Auffallend ist, dass die Unterschiede nur zum Zeitpunkt 1 zwischen den Gruppen bestehen, also noch vor der Ischämiezeit. Zu diesem Zeitpunkt wären eigentlich ähnlich hohe Werte zu erwarten gewesen.

**Tab 5.1:** ISEL-positive Zellen in %  $\pm$  Standardabweichung

Gruppe	1	2	3
<b>Zeitpunkt 1</b>	28,9 $\pm$ 9,1	11,2 $\pm$ 6,8	15,3 $\pm$ 7,6
<b>Zeitpunkt 2</b>	22,4 $\pm$ 9,3	13,6 $\pm$ 9,3	9,7 $\pm$ 7,8
<b>Zeitpunkt 3</b>	10,0 $\pm$ 7,7	15,5 $\pm$ 11,6	20,6 $\pm$ 6,8

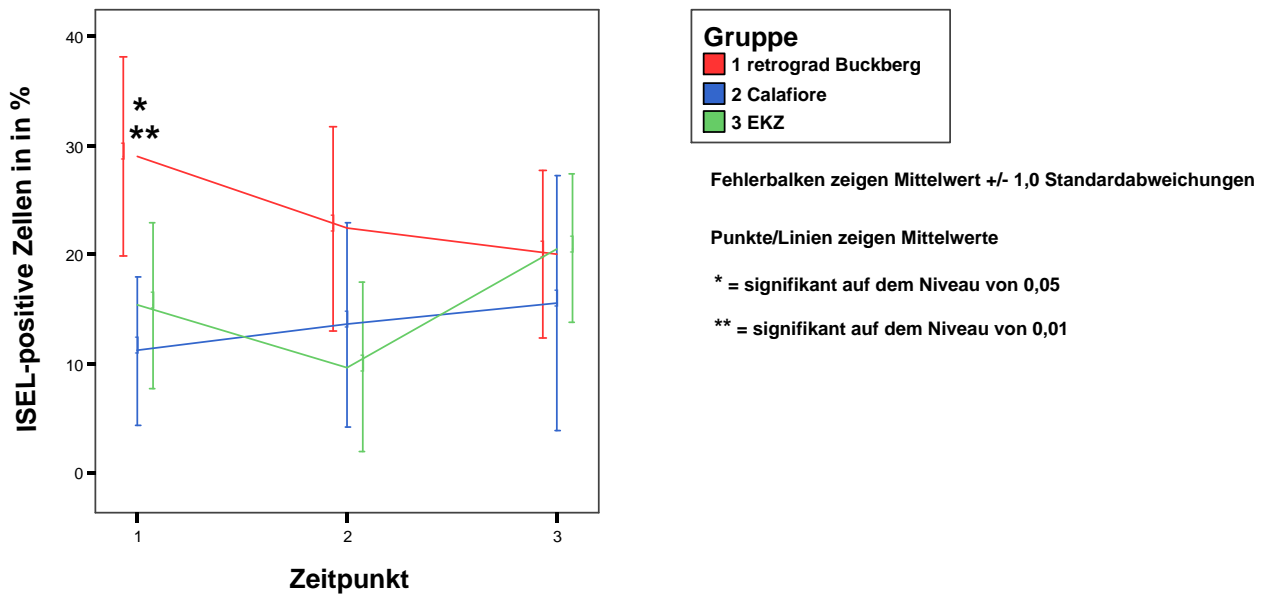


Abb. 5.2: Zeitverlauf der DNA-Fragmentationsrate (ISEL)

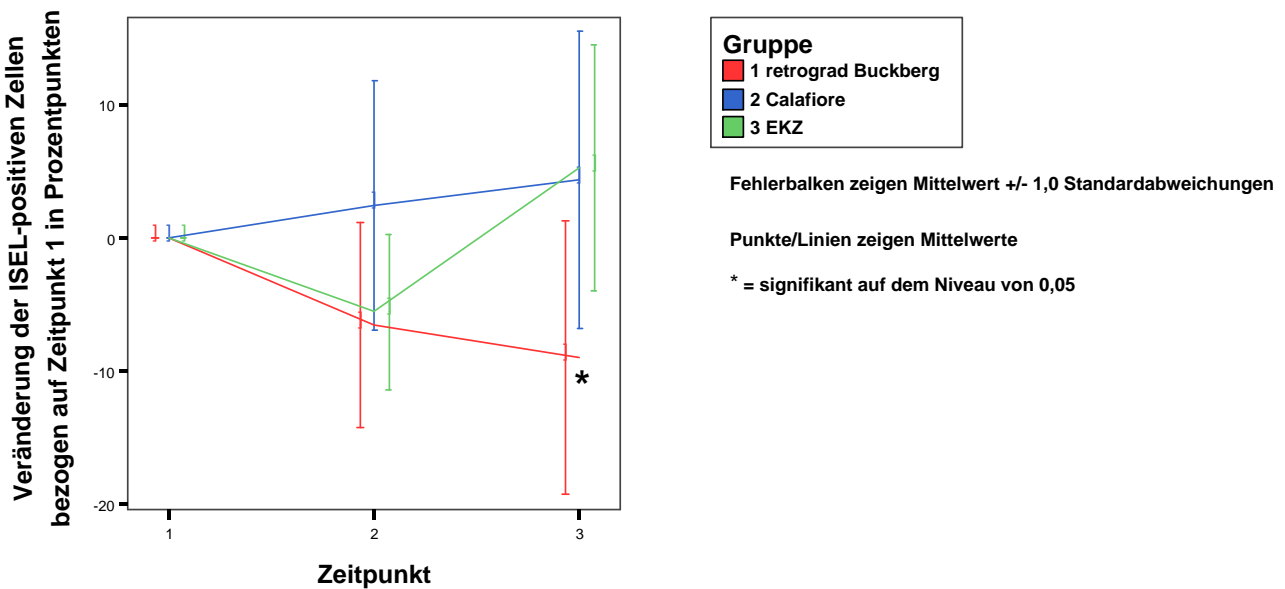


Abb 5.3: Veränderung der DNA-Fragmentationsrate (ISEL) bezogen auf den Zeitpunkt 1

Betrachtet man nur die Veränderung der Fragmentationsrate bezogen auf den Zeitpunkt 1, gibt es nur zum Zeitpunkt 3 zwischen der Gruppe 1 und der Kontrollgruppe 3 einen nachweisbaren Unterschied mit  $p = 0,03$ . Auffällig ist, dass ein gegensätzlicher Verlauf in der Calafiore Gruppe und der Gruppe mit der retrograden Kardioplegie zu erkennen ist. Die Raten

der EKZ Gruppe fallen postischämisch leicht ab, um dann aber nach 6 h auf das Niveau der Gruppe 2 anzusteigen.

### **5.1.2 Morphometrische Messung der tTG-Expression**

In den der ISEL-Methode direkt folgenden Semidünnschnitten wurde das apoptoseassoziierte Enzym Tissue Transglutaminase immunhistochemisch nachgewiesen.

Dabei zeigte sich typischerweise eine Verteilung in Form von braunen Farbstoffakkumulaten im Zytoplasma, vereinzelt konnte tTG jedoch auch im Zellkern nachgewiesen werden. Der Rest der Zellanschnitte erschien dagegen relativ homogen hell und ohne Nachweis von tTG. Im Endothel und in Bindegewebszellen ist die Expression von tTG physiologisch (Thomazy und Fesus 1989), es zeigte sich ein deutlicher immunhistochemischer Nachweis des Enzyms in diesen Zelltypen. Sowohl die im Interstitium befindlichen Farbstoffreste, als auch der Nachweis in den Endothel- und Bindegewebszellen wurden in der Auswertung, wie weiter oben im Abschnitt Methodik beschrieben, nicht mit einbezogen.

#### **5.1.2.1 Berechnungsparameter**

Bei allen Biopsien wurden 3 bei 400 x Vergrößerung aufgenommene Gesichtsfelder als Grundfläche verwendet und dann, wie im Methodikabschnitt beschrieben, ausgewertet.

#### **5.1.2.2 tTG-Expressionsrate**

Bei dem Verlauf der tTG-Expression zeigte sich innerhalb der Gruppen ebenfalls keine signifikante Veränderung an den einzelnen Zeitpunkten. Auffallend ist die sich nur geringfügig ändernde Expressionsrate, die dann am Versuchsende in etwa auf den Ausgangswert zurückgeht.

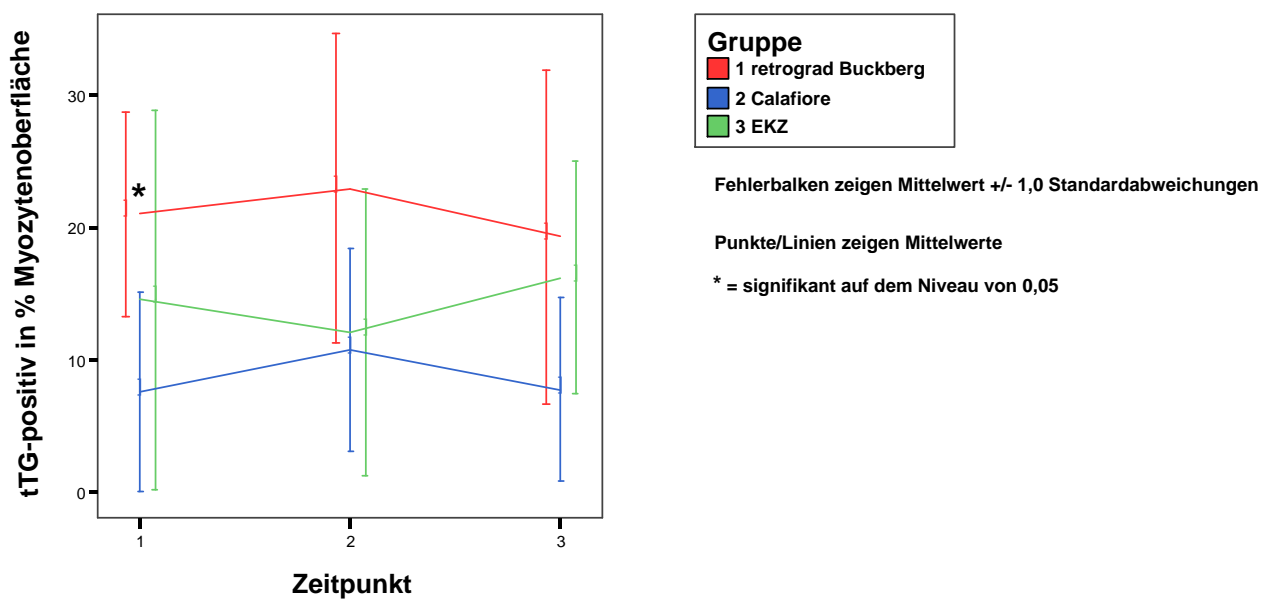
Beim Vergleich untereinander unterscheiden sich die Gruppen 1 und 2 zum Zeitpunkt 1 mit  $p = 0,05$ . Auch bei der tTG-Expression fallen in den einzelnen Gruppen stark unterschiedliche Raten zu Beginn der Versuche auf. Die einzelnen Gruppen bleiben über den ganzen Versuchsablauf auf unterschiedlichen Expressionsniveaus.

Die beiden Versuchsgruppen zeigen einen leichten Anstieg nach der EKZ, der jedoch dann wieder auf das Ausgangsniveau absinkt. Die Kontrollgruppe verzeichnet, im Gegensatz dazu, einen leichten Abfall zum Zeitpunkt 2. Alle Veränderungen zeigten keine Signifikanzen.



**Tab. 5.2:** Expressionsrate der tTG in % Myozytenoberfläche  $\pm$  Standardabweichung

Gruppe	1	2	3
<b>Zeitpunkt 1</b>	21,0 $\pm$ 7,6	7,6 $\pm$ 7,6	14,5 $\pm$ 14,3
<b>Zeitpunkt 2</b>	22,9 $\pm$ 11,6	10,8 $\pm$ 7,7	12,0 $\pm$ 10,8
<b>Zeitpunkt 3</b>	19,2 $\pm$ 12,6	7,7 $\pm$ 6,9	16,2 $\pm$ 8,8

**Abb. 5.4:** Zeitverlauf der tTG-Expression

Betrachtet man die Veränderung der tTG-Expressionsrate bezogen auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt 1, so zeigt sich für die beiden Versuchsgruppen 1 und 2 ein fast gleichförmiger Verlauf mit einem leichten Anstieg nach der Ischämiezeit. Die Expressionsrate geht nach Ende der Nachbeobachtungszeit in beiden Gruppen jedoch wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Die bestimmten tTG-Werte für die Kontrollgruppe verliefen interessanterweise entgegengesetzt. Es kam zu einem postischämischen Abfall der Expression, bis zum Versuchsende pendelten sich die Werte jedoch wieder auf die Höhe der zu Versuchsbeginn gemessenen Expressionsrate ein (Abb. 5.5).

Keine der gemessenen Veränderungen erreichte ein statistisch signifikantes Niveau.

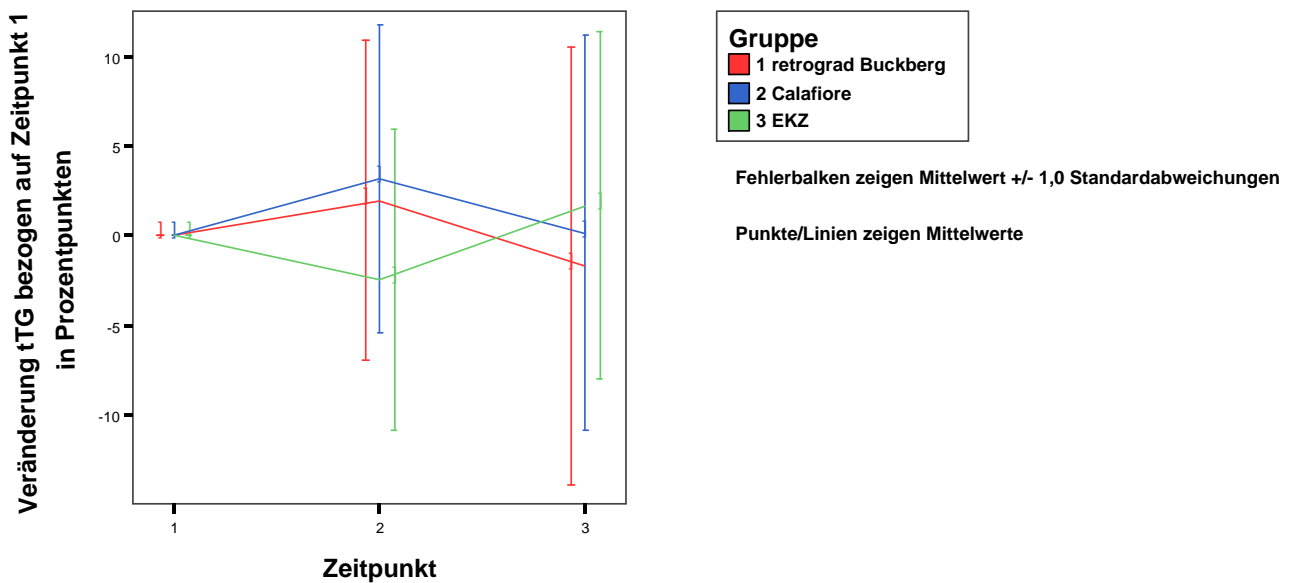


Abb. 5.5: Veränderung der tTG-Expressionsrate bezogen auf den Zeitpunkt 1

### 5.1.3 Korrelation der histologischen Marker

Die beiden histologischen Marker tTG-Expression und die Rate der DNA-Fragmentation (ISEL) korrelieren mit einem  $r_{sp} = 0,749$  sehr gut positiv miteinander. Es zeigte sich ein auf dem Niveau von  $p \leq 0,01$  hoch signifikanter Zusammenhang der beiden in dieser Arbeit verwendeten Apoptosemarker.

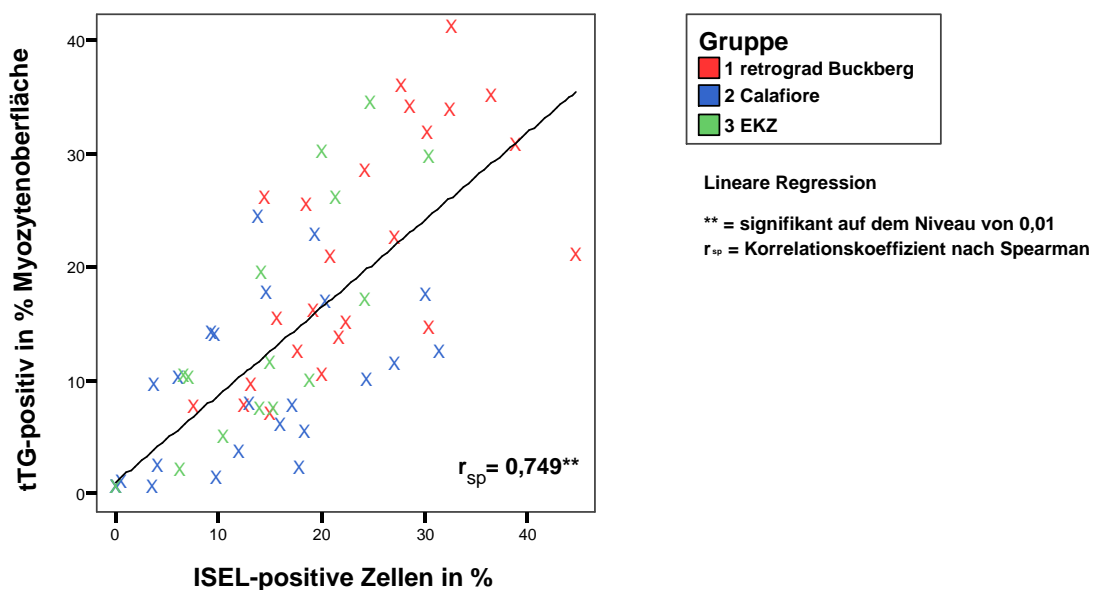


Abb. 5.6: Korrelation der tTG-Expression und der DNA-Fragmentationsrate (ISEL)

## 5.2 Messwerte der Versuche

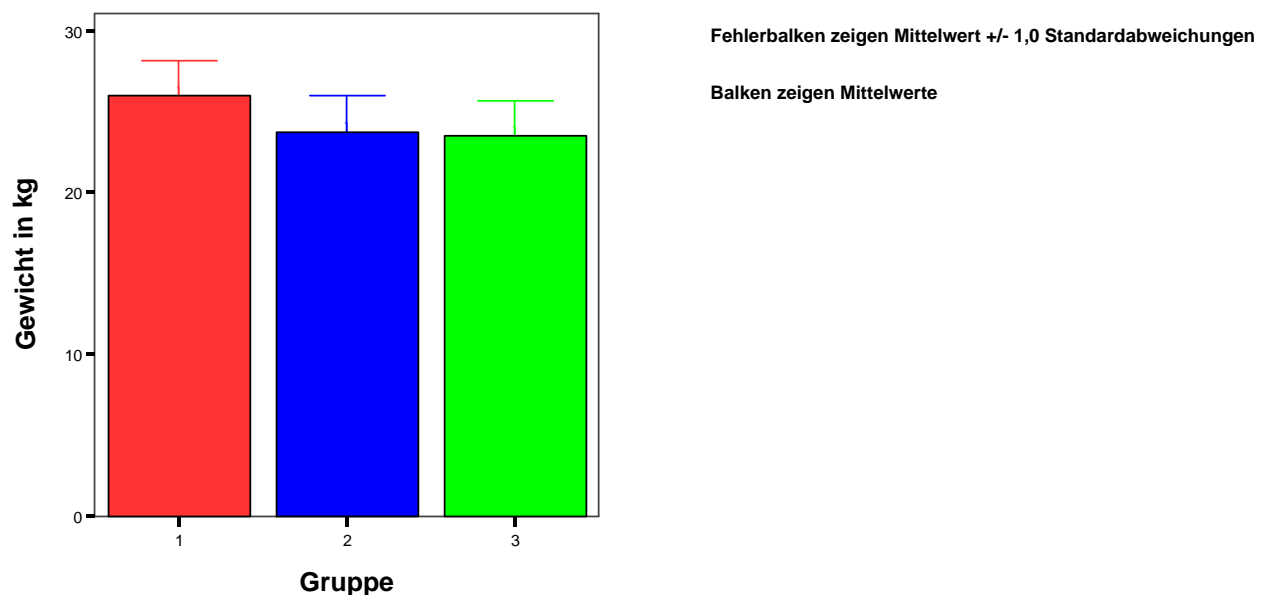
### 5.2.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere der 3 Gruppen waren weibliche Hausschweine und hatten in etwa das gleiche Alter von 11 - 15 Wochen.

Es zeigten sich im Vergleich der Gruppen keine signifikanten Unterschiede im Gewicht auf (Abb. 5.7).

**Tab. 5.3:** Gewicht der Versuchstiere (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore, Gruppe 3 = Kontrolle)  $\pm$  Standardabweichung in kg

Gruppe	1	2	3	gesamt
Mittelwert	26,0	23,8	23,5	24,4
Standardabweichung	$\pm 2,2$	$\pm 2,2$	$\pm 2,1$	$\pm 2,3$



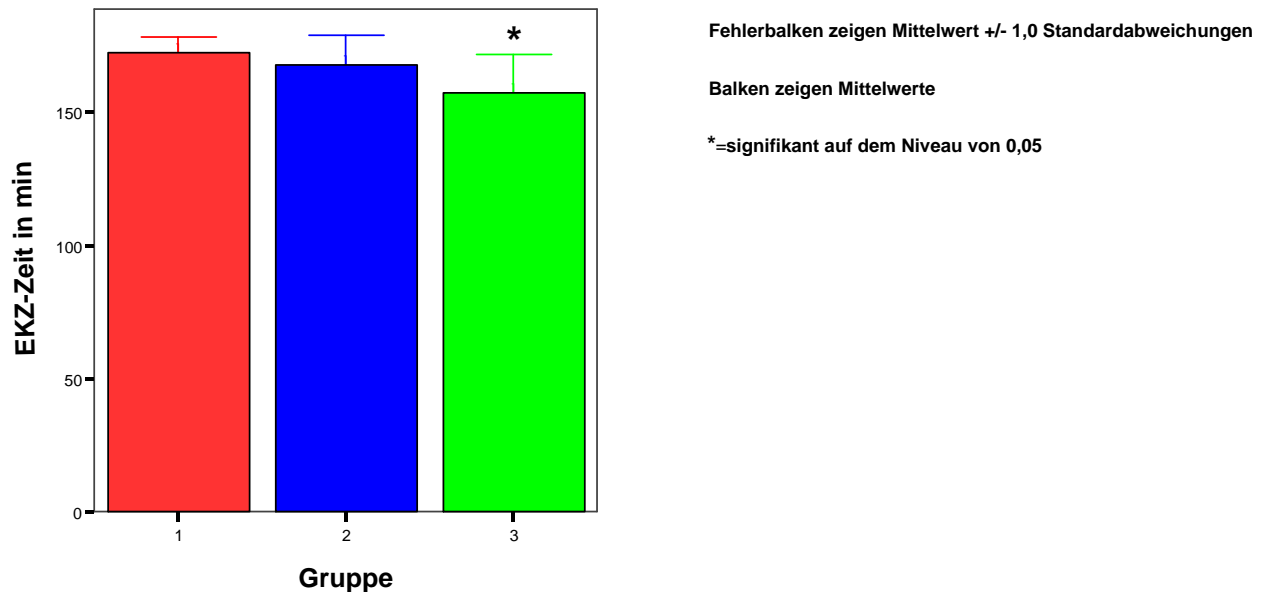
**Abb. 5.7:** Gewicht der Versuchstiere (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore, Gruppe 3 = Kontrolle)

### 5.2.2 EKZ-Zeiten

Die Zeiten für die Extrakorporale Zirkulation (EKZ), in der das Herz durch die Herz-Lungen-Maschine entlastet wurde, hat in den drei Gruppen  $173 \pm 6$  min (Gruppe 1) vs.  $168 \pm 11$  min (Gruppe 2) vs.  $157 \pm 14$  min (Gruppe 3) betragen. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur zwischen der Gruppe 1 mit der retrograden Buckbergkardioplegie und der Kontrollgruppe 3 ohne Herzstillstand mit  $p = 0,03$  (Abb. 5.8).

**Tab. 5.4:** EKZ-Zeiten (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore, Gruppe 3 = Kontrolle)  
± Standardabweichung in min

Gruppe	1	2	3	gesamt
Mittelwert	173	168	157	167
Standardabweichung	± 6	± 11	± 14	± 11



**Abb. 5.8:** EKZ-Zeiten der 3 Versuchsgruppen (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore, Gruppe 3 = EKZ)

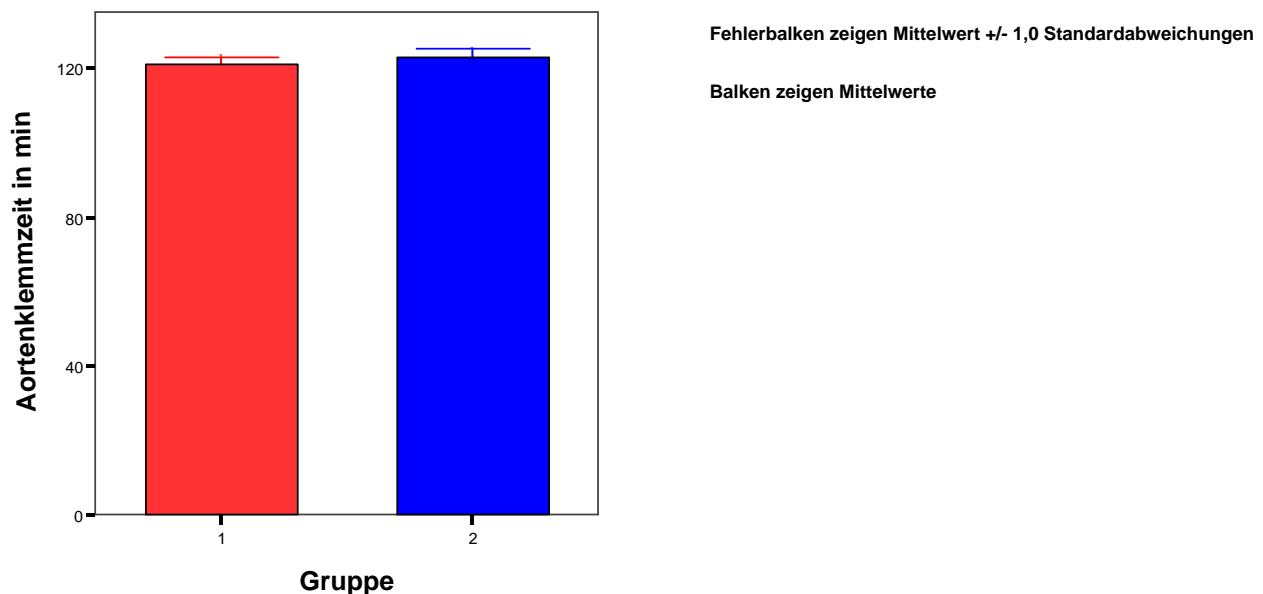
Die Klemmzeit der Aorta, durch die das Herz aus dem Blutkreislauf ausgeschlossen wurde und in der keine Myokarddurchblutung stattfand, dauerte in der Gruppe 1  $121 \pm 2$  min vs.  $123 \pm 3$  min in Gruppe 2 ( $p = n. s.$ ) (Abb. 5.9).

Auch für die Reperusionszeit unter EKZ-Unterstützung nach dem kardioplegischen Herzstillstand ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei  $50 \pm 4$  min in Gruppe 1 vs.  $42 \pm 11$  min in Gruppe 2 ( $p = n.s.$ ) (Abb. 5.10).

**Tab. 5.5:** Aortenklammzeiten (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore)

$\pm$  Standardabweichung in min

Gruppe	1	2	gesamt
Mittelwert	121	123	122
Standardabweichung	$\pm 2$	$\pm 3$	$\pm 2$

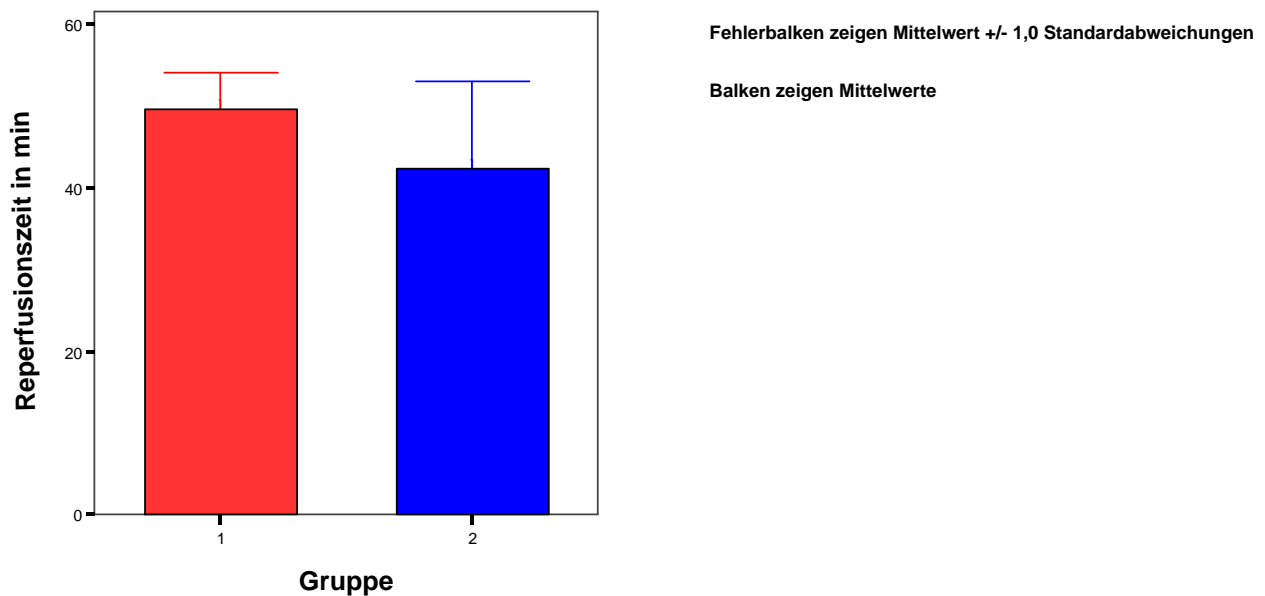


**Abb. 5.9:** Aortenklammzeiten in den beiden Versuchsgruppen (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore)

**Tab. 5.6:** Reperusionszeiten (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore)

± Standardabweichung in min

Gruppe	1	2	gesamt
Mittelwert	50	42	46
Standardabweichung	± 4	± 11	± 9

**Abb. 5.10:** Reperusionszeit in den beiden Versuchsgruppen (Gruppe 1 = retrograd Buckberg, Gruppe 2 = Calafiore)

### 5.2.3 Hämodynamik- und Laborparameter

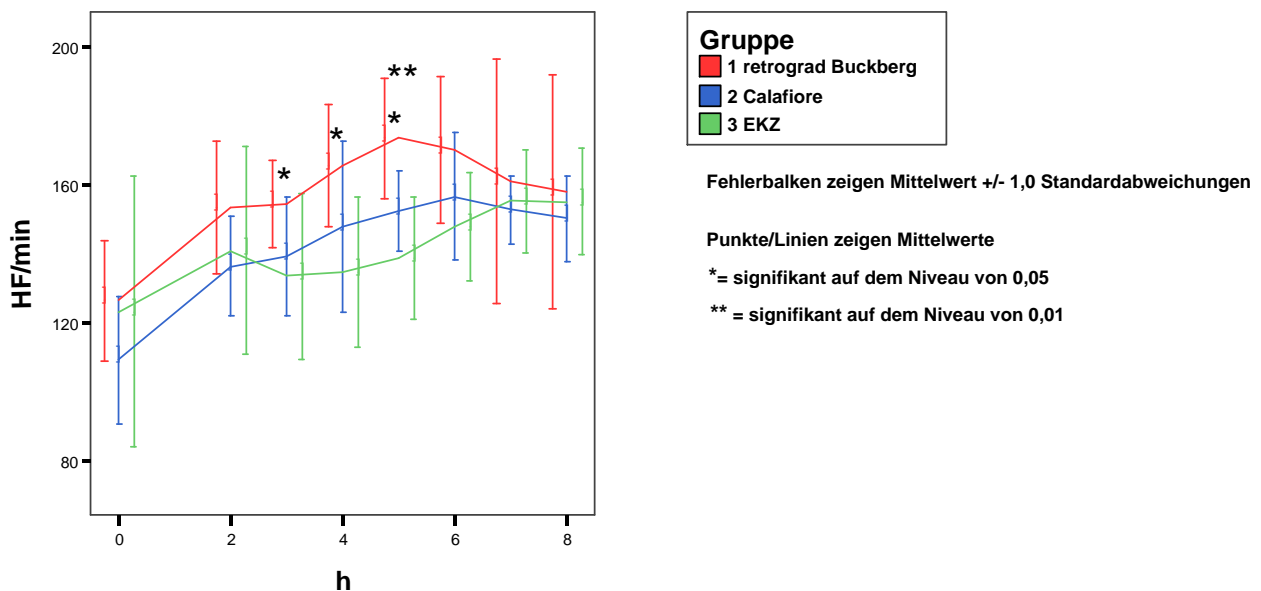
Allgemein konnte in der Gruppe 2 mit der IAWBC nach Calafiore ein besserer klinischer Verlauf beobachtet werden. So traten weniger Arrhythmien auf und das Herz zeigte nach dem kardioplegischen Stillstand ein schnelleres Wiederaufnehmen der Pumpfunktion. Für die Reperusionszeit konnte zwar kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, aber die kürzere Zeit resultiert aus der schneller normalisierten Herzleistung. Auch zeigten sich die Tiere der IAWBC-Gruppe während der Nachbeobachtungszeit hämodynamisch stabiler als die Gruppe mit der Buckbergkardioplegie.

### 5.2.3.1 Herzfrequenz

Bei der Herzfrequenz zeigte sich ein in allen Versuchsgruppen gleichförmiger Verlauf mit einem deutlichen Anstieg nach der EKZ. Die Werte in den Gruppen 2 und 3 stiegen danach noch langsam weiter bis etwa 6 h nach EKZ-Beginn und blieben dann bis zum Ende des Versuches im Mittel bei etwa 155 Schlägen\*min<sup>-1</sup> konstant. In Gruppe 1 zeigten sich kontinuierlich höhere Frequenzwerte bis 6 h nach Beginn der EKZ, danach fielen sie wieder auf das Niveau der beiden anderen Gruppen. Es wurden Signifikanzen zwischen den Gruppen 1 und 2 zu den Zeitpunkten 3 (p = 0,05) und 5 (p = 0,007) festgestellt. Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 3 ergaben sich 4 h nach Beginn der EKZ mit einem p = 0,019 bzw. nach 5 h mit p = 0,011.

**Tab 5.7:** Mittelwerte der Herzfrequenzen  $\pm$  1 Standardabweichung

HF *min <sup>-1</sup>	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	127 $\pm$ 18	154 $\pm$ 19	155 $\pm$ 13	166 $\pm$ 18	174 $\pm$ 17	170 $\pm$ 21	161 $\pm$ 35	158 $\pm$ 34
<b>Gruppe 2</b>	109 $\pm$ 18	137 $\pm$ 14	140 $\pm$ 17	148 $\pm$ 25	153 $\pm$ 12	157 $\pm$ 18	153 $\pm$ 10	150 $\pm$ 12
<b>Gruppe 3</b>	123 $\pm$ 39	141 $\pm$ 30	134 $\pm$ 24	135 $\pm$ 22	139 $\pm$ 18	148 $\pm$ 16	156 $\pm$ 15	155 $\pm$ 15



**Abb. 5.11:** Zeitverlauf der Herzfrequenz

### 5.2.3.2 Arterieller Mitteldruck (MAP)

Die gemessenen arteriellen Mitteldrücke in den beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich fast nicht von einander und verlaufen in etwa gleichförmig. Eine Ausnahme bildet jedoch die Gruppe 1, in der der MAP direkt nach der EKZ zwar deutlicher im Vergleich zur Gruppe 2 abfällt, jedoch nicht signifikant niedriger ist. Die Blutdruckwerte der Kontrollgruppe sind zum Zeitpunkt 0 h geringer (Gruppe 1 vs. Gruppe 3  $p = 0,03$ , Gruppe 2 vs. Gruppe 3  $p = \text{n.s.}$ ), als in den beiden Versuchsgruppen, jedoch ab 1 h nach EKZ-Ende für den Rest der Versuchszeit signifikant höher. Zeitpunkt 2 h: Gruppe 1 vs. 2  $p = 0,015$ , Zeitpunkt 3 h: Gruppe 1 vs. 3  $p = 0,019$ , Zeitpunkt 4 h: Gruppe 1 vs. 3  $p = 0,003$ , Zeitpunkt 5 h: Gruppe 1 vs. 3  $p = 0,006$ , Zeitpunkt 6 h: Gruppe 1 vs. 3  $p = 0,011$ , Zeitpunkt 8 h: Gruppe 1 vs. 3  $p = 0,004$ .

Tab 5.8: Mittelwerte des MAP  $\pm$  1 Standardabweichung

MAP in mmHg	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	86 $\pm$ 14	60 $\pm$ 11	69 $\pm$ 6	69 $\pm$ 7	72 $\pm$ 8	71 $\pm$ 11	72 $\pm$ 11	60 $\pm$ 4
<b>Gruppe 2</b>	89 $\pm$ 17	81 $\pm$ 21	75 $\pm$ 17	77 $\pm$ 18	77 $\pm$ 21	75 $\pm$ 20	69 $\pm$ 20	68 $\pm$ 17
<b>Gruppe 3</b>	66 $\pm$ 11	64 $\pm$ 17	85 $\pm$ 14	91 $\pm$ 9	94 $\pm$ 12	87 $\pm$ 9	82 $\pm$ 10	77 $\pm$ 5

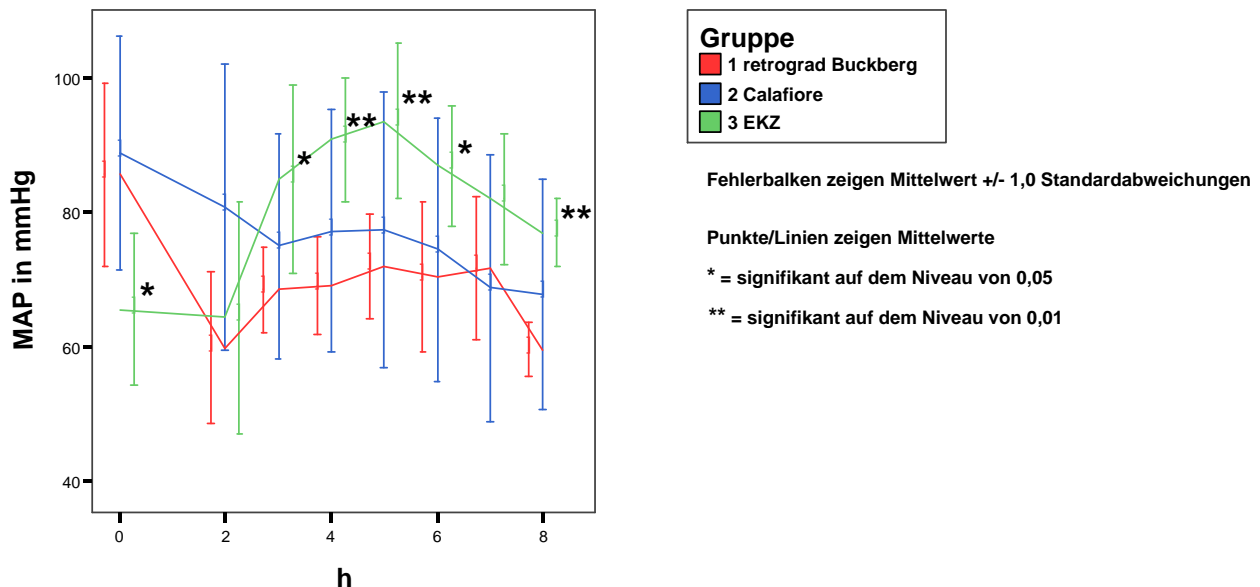


Abb. 5.12: Verlauf des arteriellen Mitteldrucks

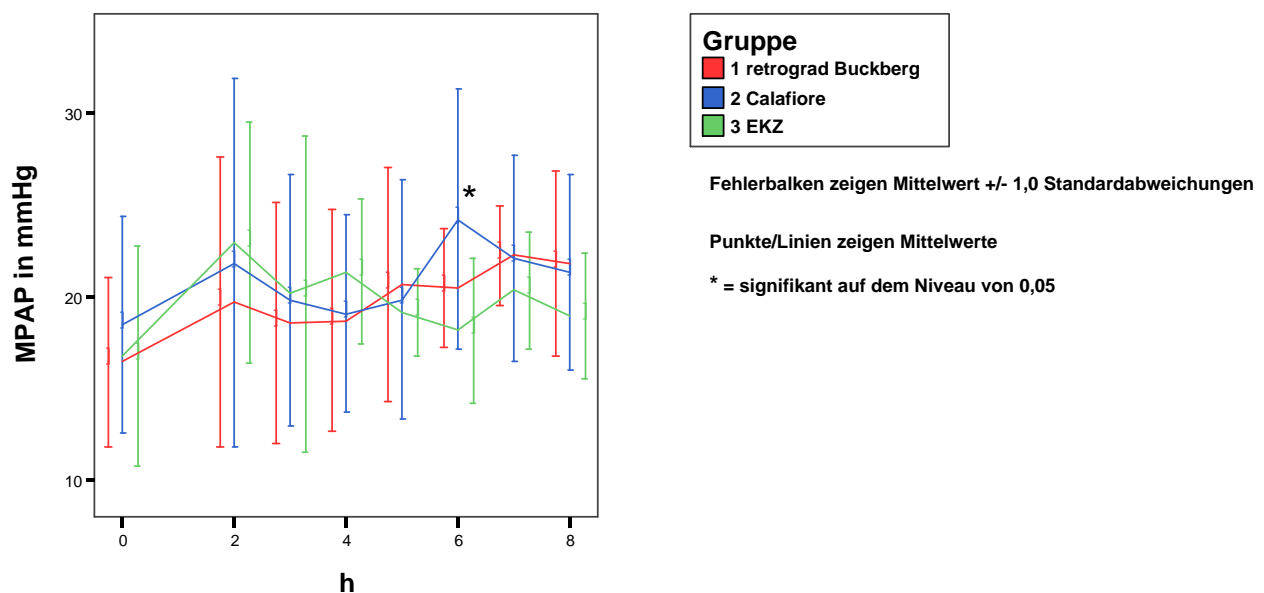


### 5.2.3.3 Pulmonalarterieller Mitteldruck (MPAP)

Der pulmonalarterielle Mitteldruck verhielt sich in allen 3 Gruppen in etwa gleich. Es zeigte sich ein leichter Anstieg nach Beendigung der EKZ, danach fielen die Werte auf ein mittleres Niveau zurück. Lediglich nach 6 h zeigte sich eine als Ausreißer zu wertende Druckspitze in der Gruppe 2, die sich mit einem  $p = 0,045$  von Gruppe 3 unterschied, jedoch nicht von der Gruppe 1. Danach gingen die Druckwerte wieder auf ein mit den anderen Gruppen vergleichbares Niveau zurück.

**Tab 5.9:** Mittelwerte des MPAP  $\pm$  1 Standardabweichung

MPAP in mmHg	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	17 $\pm$ 5	20 $\pm$ 8	19 $\pm$ 7	19 $\pm$ 6	21 $\pm$ 6	21 $\pm$ 3	22 $\pm$ 3	22 $\pm$ 5
<b>Gruppe 2</b>	19 $\pm$ 6	22 $\pm$ 10	20 $\pm$ 7	19 $\pm$ 5	20 $\pm$ 7	24 $\pm$ 7	22 $\pm$ 6	21 $\pm$ 5
<b>Gruppe 3</b>	17 $\pm$ 6	23 $\pm$ 7	20 $\pm$ 9	21 $\pm$ 4	19 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	20 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3



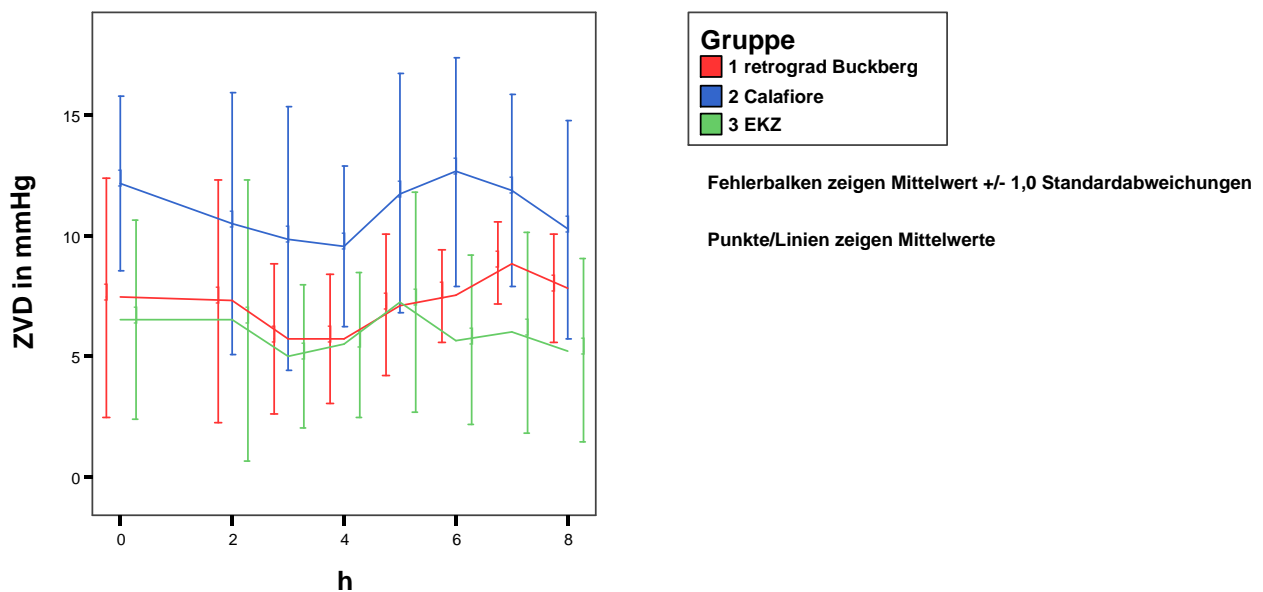
**Abb. 5.13:** Zeitverlauf des pulmonalarteriellen Mitteldrucks

### 5.2.3.4 Zentraler Venendruck (ZVD)

Die ZVD-Werte der 3 Gruppen verhielten sich während des Versuches in etwa gleichförmig. Es zeigte sich ein Druckabfall 3 - 4 h nach EKZ-Beginn in allen Gruppen, der sich jedoch wieder normalisierte. In Gruppe 2 wurden kontinuierlich höhere Werte gemessen, der Kurvenverlauf ist mit den anderen Gruppen aber vergleichbar, so dass die Veränderungen in etwa auf dem gleichen Niveau verliefen.

**Tab 5.10:** Mittelwerte des ZVD  $\pm$  1 Standardabweichung

ZVD in mmHg	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	$7 \pm 5$	$7 \pm 5$	$6 \pm 3$	$6 \pm 3$	$7 \pm 3$	$8 \pm 2$	$9 \pm 2$	$8 \pm 2$
<b>Gruppe 2</b>	$12 \pm 4$	$11 \pm 5$	$10 \pm 5$	$10 \pm 3$	$12 \pm 5$	$13 \pm 5$	$12 \pm 4$	$10 \pm 5$
<b>Gruppe 3</b>	$7 \pm 4$	$7 \pm 6$	$5 \pm 3$	$6 \pm 3$	$7 \pm 5$	$6 \pm 4$	$6 \pm 4$	$5 \pm 4$



**Abb. 5.14:** Verlauf des zentralen Venendrucks

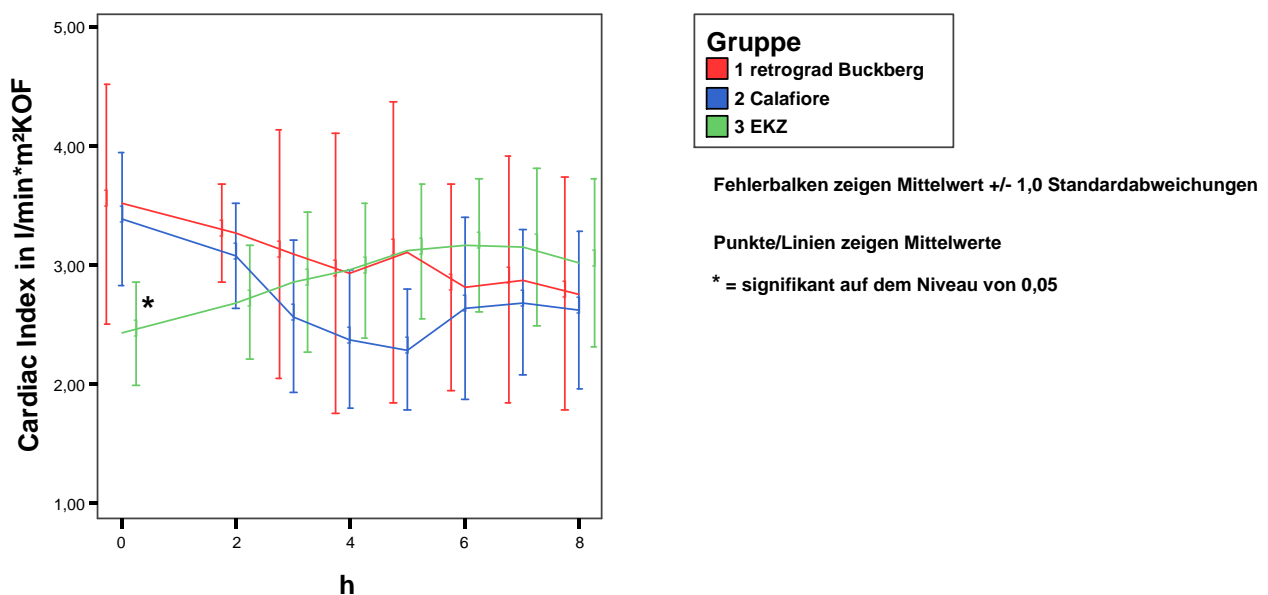
### 5.2.3.5 Cardiac Index (CI)

Zur besseren Beurteilung der interindividuellen Unterschiede wurde der so genannte *Cardiac Index* errechnet, bei dem die Pumpfunktion des Herzens auf die Körperoberfläche (KOF) in  $\text{m}^2$  bezogen wird (Formel für die KOF beim Schwein: siehe Methodik S. 33). Berechnung des *Cardiac Index*:  $\text{HZV} \cdot \text{KOF}^{-1}$ . (Abb. 5.15)

Beim CI ist auffällig, dass in der Kontrollgruppe 3 zum Zeitpunkt 0 im Schnitt ein um etwa 1 l/min niedrigerer CI als Ausgangswert gemessen wurde. Es zeigten sich ein signifikanter Unterschied zu der Versuchsgruppen 2 mit  $3,4 \pm 0,6$  l/min (Gruppe 2) vs.  $2,4 \pm 0,4$  l/min (Gruppe 3)  $p = 0,011$ , zu Gruppe 1 konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Zwischen den 3 Gruppen konnten im weiteren Versuchverlauf keine statistisch sicheren Unterschiede festgestellt werden.

**Tab 5.11:** Mittelwerte des CI  $\pm$  1 Standardabweichung

CI in l/min*m <sup>2</sup>	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	$3,5 \pm 1,0$	$3,3 \pm 0,4$	$3,1 \pm 1,0$	$2,9 \pm 1,2$	$3,1 \pm 1,3$	$2,8 \pm 0,9$	$2,9 \pm 1,0$	$2,8 \pm 1,0$
<b>Gruppe 2</b>	$3,4 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,7$
<b>Gruppe 3</b>	$2,4 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,5$	$2,9 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,8$	$3,1 \pm 0,9$	$3,2 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,7$	$3,0 \pm 0,7$



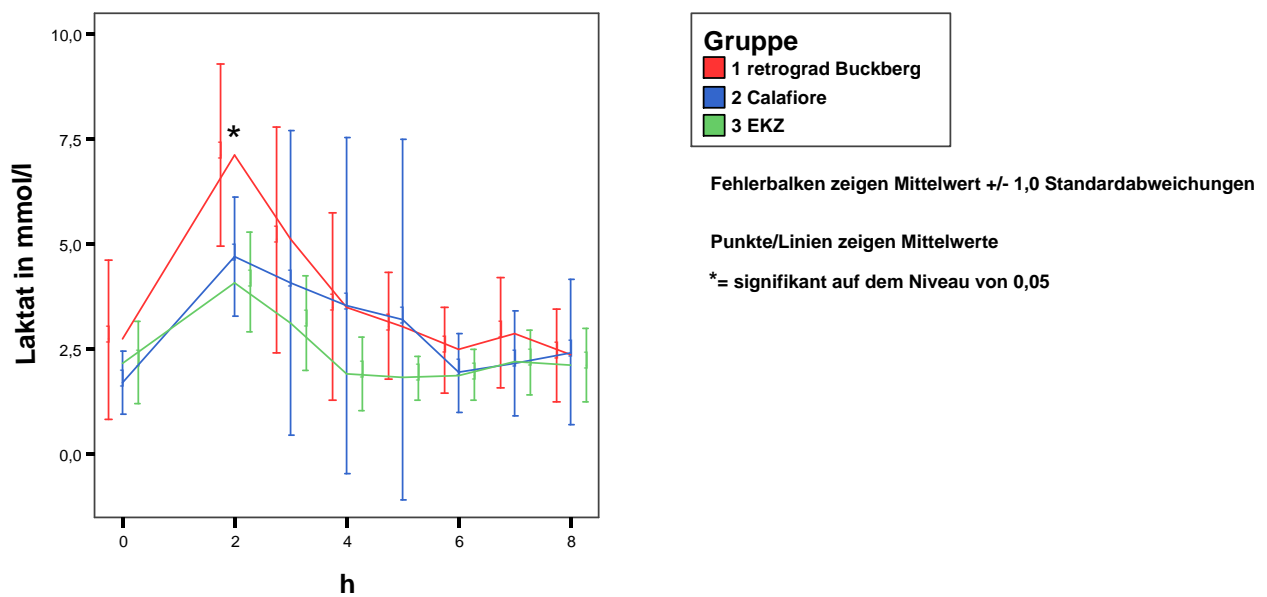
**Abb. 5.15:** Zeitverlauf des *Cardiac Index*

### 5.2.3.6 Laktat

Bei der Laktatkonzentration im Blut zeigten sich direkt nach dem Ende der EKZ signifikant erhöhte Werte in der Gruppe 1 mit  $7,1 \pm 2,2$  mmol/l vs.  $4,7 \pm 1,4$  mmol/l in Gruppe 2 ( $p = 0,028$ ) vs.  $4,1 \pm 1,2$  mmol/l in Gruppe 3 ( $p = 0,013$ ). Im weiteren Verlauf der Versuche normalisierten sich die Werte wieder und es zeigten sich keine weiteren signifikanten Unterschiede (Abb. 5.16).

**Tab 5.12:** Mittelwerte der Laktatkonzentration  $\pm 1$  Standardabweichung

Laktat in mmol/l	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	$2,8 \pm 1,9$	$7,1 \pm 2,2$	$5,1 \pm 2,7$	$3,5 \pm 2,2$	$3,1 \pm 1,3$	$2,5 \pm 1,0$	$2,9 \pm 1,3$	$2,4 \pm 1,1$
<b>Gruppe 2</b>	$1,7 \pm 0,7$	$4,7 \pm 1,4$	$4,1 \pm 3,6$	$3,6 \pm 4,0$	$3,2 \pm 4,3$	$2,0 \pm 1,0$	$2,2 \pm 1,3$	$2,5 \pm 1,7$
<b>Gruppe 3</b>	$2,2 \pm 1,0$	$4,1 \pm 1,2$	$3,2 \pm 1,1$	$1,9 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,9$



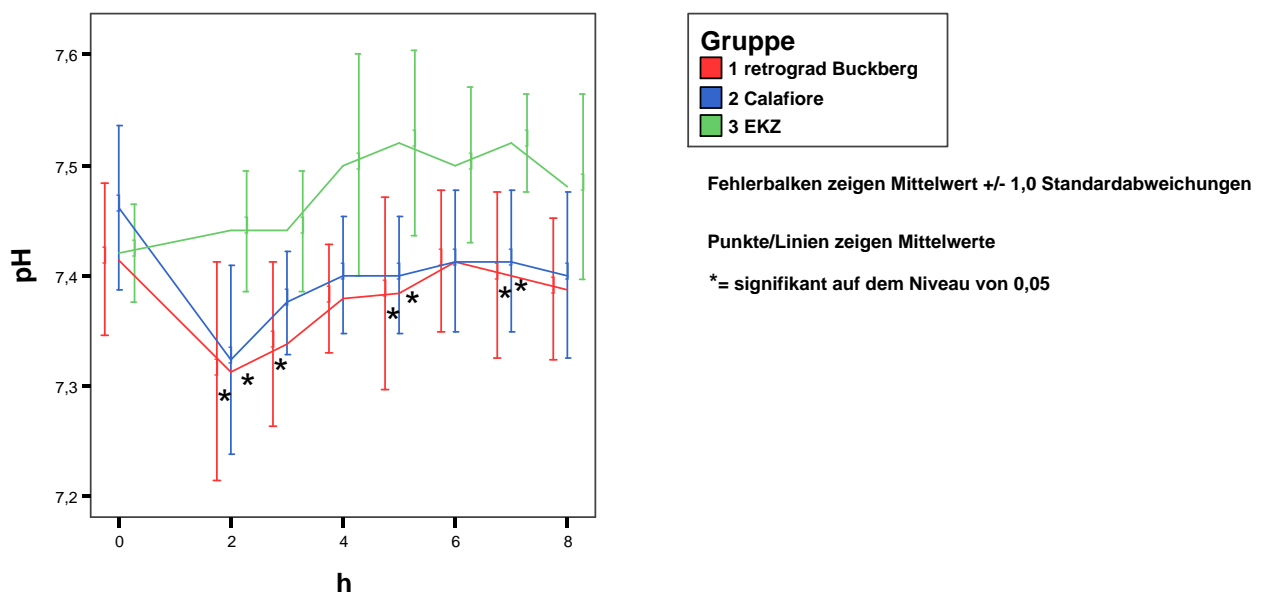
**Abb. 5.16:** Zeitverlauf der Laktatwerte

### 5.2.3.7 pH

Bei den pH-Werten fiel auf, dass die Gruppen mit kardioplegischem Herzstillstand deutlich niedrigere Werte nach der EKZ aufwiesen, als die Gruppe 3. Es zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 3 zu den Zeitpunkten 2 ( $p = 0,03$ ), 3 ( $p = 0,045$ ), 5 ( $p = 0,03$ ) und 7 ( $p = 0,019$ ). Zwischen den Gruppen 2 und 3 ergaben sich Signifikanzen zum Zeitpunkt 2 ( $p = 0,019$ ), 5 ( $p = 0,03$ ) und 7 ( $p = 0,019$ ). Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 2 konnten nicht festgestellt werden. Die pH-Werte der Kontrollgruppe 3 bewegten sich im gesamten Versuchsablauf in dem für Schweine physiologischen Bereich von 7,4 – 7,5.

**Tab 5.13:** Mittelwerte der pH-Werte  $\pm$  1 Standardabweichung

pH	0 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>Gruppe 1</b>	7,4 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1
<b>Gruppe 2</b>	7,5 $\pm$ 0,1	7,3 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1
<b>Gruppe 3</b>	7,4 $\pm$ 0,0	7,4 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 0,0	7,5 $\pm$ 0,1



**Abb. 5.17:** Zeitverlauf der pH-Werte

## 6. Diskussion

Herzchirurgische Eingriffe sind zu einem großen Teil nur an einem nicht schlagenden Herzen und unter Inkaufnahme der daraus folgenden Ischämie und Reperfusion möglich. Dies gilt vor allem für die Klappenchirurgie sowie für den überwiegenden Teil der Bypasschirurgie, die zusammen bei weitem die Mehrheit der am Herzen durchgeführten chirurgischen Eingriffe darstellen (Mentzer et al. 2003).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, resultieren aus dem künstlich herbeigeführten Herzstillstand nicht unerhebliche Folgen für die Funktion der Herzmuskelzelle und damit für die postoperative Erholung des Herzens von solchen Eingriffen.

Ein großer Teil der herzchirurgischen Forschung hat sich daher in den letzten Jahren mit der Protektion des Herzens und der Erforschung der Vorgänge bei der notwendigen Ischämie und der darauf folgenden Reperfusion befasst (Cohen et al. 1999). Hieraus resultierten eine ganze Reihe von in der klinischen Praxis angewendeten Protektionsverfahren, die allesamt zu einer Verbesserung des Überlebens nach herzchirurgischen Eingriffen beigetragen haben. Dabei ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, auf welchen verschiedenen Ebenen eine Myokardschädigung auftreten kann und inwieweit dies Folgen für die klinische Praxis hat. Insbesondere auf der molekularbiologischen Ebene sind die Zusammenhänge zwischen Ischämie, Reperfusion und der postoperativ resultierenden Myokardschädigung bzw. der letztendlich daraus folgenden Funktionseinschränkung sowie deren Beeinflussung durch Protektionsverfahren noch nicht zufriedenstellend untersucht und verstanden. Auch ist nicht geklärt, welche Rolle die Apoptose beim Untergang von Herzmuskelzellen spielt und welche Regenerationsvorgänge im geschädigten Myokard ablaufen. So galten z.B. bis vor wenigen Jahren Herzmuskelzellen als ausdifferenzierte Zellen, die ihre Funktion während der gesamten Lebenszeit des Organismus ausüben. Seit der Beobachtung einzelner mitotischer Zellteilungen im Myokard wird dieses Dogma jedoch in Frage gestellt (Riede 2004). Dennoch besitzt das Myokard unzweifelhaft nur eine geringe Fähigkeit zur Proliferation, so dass der Verlust von Zellen durch Nekrose oder Apoptose zu folgeschweren Veränderungen in der Funktion des Herz-Kreislaufsystems führt (Schumann 2000).

In dieser Dissertationsarbeit sollte deshalb an einem Großtiermodell am Schwein der Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Induktion von Apoptose in Herzmuskelzellen untersucht werden und, falls vorhanden, der Einfluss der Apoptose auf den Funktionsverlust des Herzmuskels bestimmt werden. Zusätzlich sollten in diesem Kontext zwei verschiedene in der klinischen Praxis routinemäßig verwendete Kardioplegielösungen bzw. -verfahren auf ihr

Protektionsverhalten und auf ihren Einfluss auf die Apoptoserate im Myokard nach prolongierter Ischämie untersucht werden. Bis jetzt sind nur wenige Studien über die Beziehungen zwischen Kardioplegie und Apoptoserate veröffentlicht worden, darüber hinaus existieren in diesem Zusammenhang bis jetzt noch keine vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen Lösungen und Techniken zur Myokardprotektion (Anselmi et al. 2004).

## 6.1 Versuchsaufbau

Bei dieser Arbeit wurde ein Großtiermodell am Schwein eingesetzt, um einen dem klinischen Alltag sehr nahe kommenden Versuchsaufbau zu ermöglichen. Schweine sind bezüglich ihrer kardiovaskulären Anatomie dem Menschen am nächsten und sind die am besten etablierte Tierspezies für Großtierversuche (McClellan 1968). Es sollte damit eine möglichst große Aussagekraft und Übertragbarkeit der ermittelten Ergebnisse erreicht werden.

Genaue Aussagen über die Zeitdauer zwischen Schädigung, Induktion und endgültigem Abschluss der Apoptose sind nur schwer zu treffen. Es existieren verschiedene Angaben in der Literatur, die sich sehr von einander unterscheiden. Nadal-Ginard et al. geben etwa 4 Stunden, T. N. James gibt ca. 6 Stunden bis zum kompletten Abschluss an (James 1998, Nadal-Ginard et al. 2003). Dagegen geht Saraste davon aus, dass der gesamte Prozess der Apoptose etwa 12 bis 24 Stunden in Anspruch nimmt. Erste spezifische biochemische und morphologische Veränderungen seien jedoch schon nach weniger als 2 Stunden messbar (Saraste 1999). Ergänzend zu Saraste kommen Suzuki et al. in ihrer Arbeit über Kardiomyozyten zu dem Schluss, dass zwar nach etwa 2 - 4 Stunden der Vorgang nicht mehr reversibel ist, er aber erst nach etwa 14 Stunden abgeschlossen ist (Suzuki et al. 2001). Auch scheint die Reperfusion einen großen Einfluss auf die Apoptoserate zu haben. Längere Phasen von myokardialer Ischämie steigern die Rate der Nekrose, Reperfusion erhöht jedoch, auf den ersten Blick paradoxerweise, die Zahl der apoptotischen Zellen (Gottlieb et al. 1994, Eefting et al. 2004). Dies wird jedoch verständlich, wenn man bedenkt, dass durch die Reperfusion die Zellen wieder mit Sauerstoff und Energieträgern versorgt werden und die Apoptose ein energieabhängiger Prozess ist. Man geht davon aus, dass die Apoptose durch eine Ischämie getriggert werden kann, aber die Reperfusion den Prozess erst möglich macht und ihn auch deutlich beschleunigt (Gottlieb et al. 1994, Freude et al. 2000, Zhao et al. 2000, Eefting et al. 2004).

Daraus ergibt sich bei einer klinischen Studie das Problem, dass das durch das operative Vorgehen vorgegebene kurze Zeitintervall zwischen der ersten Kontrollbiopsie vor und der zweiten nach der Schädigung nur wenig Zeit liegt und das Myokard nur kurzzeitig wieder reperfundiert wurde. Dies kann dazu führen, dass sich apoptotische Zellen erst in der Initialphase der Kaskade befinden und so nicht entdeckt werden. Nur durch eine weitere Biopsie mit einem genügenden zeitlichen Abstand zur Schädigung kann dieses Problem vermieden werden (Anselmi et al. 2004). Im Gegensatz dazu besteht im tierexperimentellen Modell die Möglichkeit, eine weitere Probe zu einem späteren Zeitpunkt zu entnehmen. In dem von uns verwendeten experimentellen Aufbau wurde deshalb eine dritte Biopsie 6 Stunden nach Beendigung der Reperfusion entnommen. Dies trägt auf der einen Seite dem von Anselmi et al. beschriebenen Problem der zu kurzen Zeitspanne Rechnung, auf der anderen Seite ist es ein guter Kompromiss zwischen den differierenden Zeitangaben für den Apoptoseablauf.

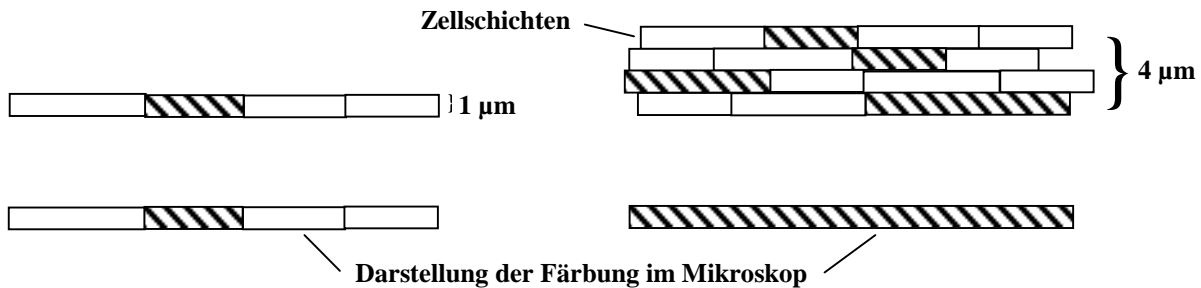
Die gängigen biochemischen Marker im Serum, die für die Bestimmung einer Myokardschädigung üblicherweise in der Klinik herangezogen werden, wie z.B. CK-MB, Troponin I bzw. T, repräsentieren nur eine Schädigung durch Nekrose und sind nicht sensitiv für apoptotische Vorgänge. Bei der Apoptose erfolgt definitionsgemäß keine Membranruptur und es kommt folglich auch zu keiner Freisetzung von intrazellulären Proteinen, die im Blut gemessen werden könnten (Anselmi et al. 2004). Bis heute sind keine verlässlichen Serummarker isoliert worden, so dass nur durch eine histologische Untersuchung von Myokardbiopsien eine Aussage über die Apoptoserate möglich ist. Die Sensitivität und Spezifität der in dieser Arbeit verwendeten histologischen Marker wird später noch ausführlich diskutiert.

## 6.2 Immunhistochemie von Semidünnschnitten

Die in dieser Arbeit verwendete Technik der Semidünnschnitte ist eine wesentliche Voraussetzung für eine sichere und sensitive Beurteilung der Biopsien auf zellulärem Niveau. Durch die geringe Dicke von nur 1  $\mu\text{m}$  ist es möglich einzelne Zellen überlagerungsfrei in ihrem Färbeverhalten zu beurteilen (Abb. 6.1). Darüber hinaus können in konsekutiven Folgeschnitten die gleichen Zellen mit einem anderen Marker auf mögliche Unterschiede oder mit einer anderen Fragestellung untersucht werden. Insgesamt können so bis zu 10 Schnitte durch den selben Kardiomyozyten gelegt werden und so auch kleine Biopsien effektiv mit mehreren Markern untersucht werden (Aschoff et al. 1996, Busch



2002). Bei der für in Paraffin eingebetteten Proben üblichen Schnittdicke von 4 - 10  $\mu\text{m}$  sind die subzellulären Strukturen nicht optimal für die immunhistochemischen Antikörper erreichbar, so dass erst in EPON-Harz eingebettete Semidünnschnitte eine sensitivere Anfärbung erlauben. Dieses auf Grund der Schnittdicke unterschiedliche Färbeverhalten ist bei der Verwendung der ISEL-Methode von besonderer Bedeutung (Aschoff et al. 1996).



**Abb. 6.1:** Vergleichende Darstellung des Färbeverhaltens von 1 bzw. 4  $\mu\text{m}$  dicken Schnitten (modifiziert nach Busch 2002)

### 6.3 Wertigkeit der Techniken zur Detektion von Apoptose

Wie schon in der Einleitung beschrieben, gibt es eine Vielzahl von verschiedenen Möglichkeiten zur Detektion von Apoptose in Zellen. Als sicherster Nachweis von Apoptose gilt die elektronenmikroskopische Untersuchung. Sie eignet sich jedoch nicht zur Untersuchung von größeren Gewebeproben und ist sehr subjektiv. Als die beste Methode zur quantitativen Messung der Apoptose gilt deshalb die konfokale Mikroskopie, da sie eine hohe Quantität an untersuchten Zellen bei hoher Reliabilität ermöglicht (Anversa 2000, Stadelmann und Lassmann 2000).

Für diese Arbeit wurde eine Kombination von zwei verschiedenen Markern eingesetzt, die zwei unterschiedliche Abschnitte der Apoptosekaskade repräsentieren. Diese Kombination von zwei unabhängigen Markern wird für einen sicheren Nachweis von Apoptose in der Literatur gefordert, um eine genügende Sensitivität und Spezifität zu erreichen, da kein absolut spezifischer Marker zur Detektion von Apoptose existiert (Freude et al. 1998, Stadelmann und Lassmann 2000, van Heerde et al. 2000, Krijnen et al. 2002).

### 6.3.1 Nachweis der DNA-Fragmentation durch ISEL

Die Fragmentation der Kern-DNA wird durch die caspasenvermittelte Aktivierung von DNAsen induziert, was zu den charakteristischen Doppelstrangbrüchen von 180 - 200 kDa Länge oder einem Vielfachen davon führt. Diese DNA-Fragmente werden allgemein als ein grundlegendes biochemisches Kennzeichen der Apoptose angesehen (Wyllie et al. 1980, Saraste und Pulkki 2000). Diese Bruchstücke werden in einer Gelelektrophorese als so genanntes Leiterphänomen (*DNA laddering*) sichtbar, da die Fragmente in immer gleichen Abständen entsprechend ihres Gewichtes im Agarosegel wandern. Die Gelelektrophorese ist ein leicht durchzuführender Test, gilt aber als viel zu unspezifisch. Das *DNA laddering* kann nicht zwischen verschiedenen Zelltypen unterscheiden, die Zellen können nicht im Gewebeverband beurteilt werden und es wird verhältnismäßig viel Untersuchungsmaterial benötigt. Auch die Sensitivität ist ein Problem, da nur bei einer hohen Apoptoserate deutliche Aussagen getroffen werden können (van Heerde et al. 2000). Darüber hinaus wurden von einigen Autoren wie z.B. von Oberhammer et al. auch Fragmente von 50 – 150 kDa Länge beschrieben, was das Leiterphänomen als Nachweismethode problematisch macht (Oberhammer et al. 1993).

Seit dem 1992 von Gavrieli et al. die spezifische Markierung von DNA-Brüchen durch Nukleotide beschrieben wurde, ist die Methode kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert worden, so dass sie heute als Standard zum Nachweis von Apoptose in den unterschiedlichsten Gewebetypen gilt (Gavrieli et al. 1992, Hunter et al. 2005, Takemura und Fujiwara 2006). In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass diese Methode auch im Myokard funktioniert und verlässlich zur Diagnostik eingesetzt werden kann (Saraste 1999, Saraste et al. 2000, Stadelmann und Lassmann 2000, van Heerde et al. 2000, Lotze et al. 2001, Busch 2002, Edston et al. 2002).

DNA-Fragmentation, auch wenn sie internukleosomal stattfindet, ist jedoch nicht spezifisch für Apoptose. Daher gilt auch der alleinige Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mit Hilfe der TUNEL- oder der ISEL-Methode nicht als beweisend für eine apoptotische Zelle (Saraste und Pulkki 2000, Stadelmann und Lassmann 2000). So können verschiedene Faktoren wie z.B. Autolyse, das Fixationsverfahren, Einbettung in Paraffin, nicht standardisierte Laborbedingungen, RNA-Transkription oder DNA-Reparatur zu „nichtapoptotischen“ DNA-Brüchen führen, die dann detektiert werden können (Kockx et al. 1998, Saraste 1999, Stadelmann und Lassmann 2000). Darüber hinaus werden auch

Phagozyten wie z.B. Makrophagen angefärbt, da sie DNA-Bruchstücke der von ihnen phagozytierten Zellen enthalten (van Heerde et al. 2000).

Auch bei der Nekrose tritt eine Zerstückelung der Kern-DNA auf, diese erfolgt jedoch erst sehr spät und wird durch aus dem Lysosom freigesetzte DNAsen ausgelöst, wobei Einzelstrangbrüche unterschiedlichster Länge entstehen (Dong et al. 1997). Diese Strangbrüche werden auch von den Fragmentationsassays erfasst, jedoch werden die Zellkerne nur leicht angefärbt und können so unterschieden werden. Vor allem durch die enorme Anzahl an DNA-Fragmentationen, mehrere Millionen pro Kern, erreichen die TUNEL- bzw. die ISEL-Methode ihre relative Spezifität für apoptotische Zellen (Ansari et al. 1993). Die Arbeiten von Didenko und Hornsby bzw. Gold et al. unterstützen diese Einschätzung, da sie zeigen konnten, dass mit den Fragmentationsassays Apoptose und Nekrose unterschieden werden können, obwohl auch andere, nichtapoptotische DNA-Schäden erfasst werden (Gold et al. 1994, Didenko und Hornsby 1996).

Kanoh et al. stellten die These auf, dass die mit der TUNEL- oder ISEL-Methode detektierten Zellen nicht apoptotisch sind, sondern vitale Zellen, die eine gesteigerte Rate an DNA-Reparatur in Folge einer Zellschädigung aufweisen. So beschrieben sie, dass durch TUNEL nicht nur die apoptosespezifischen freien 3'-OH Enden von Doppelstrangbrüchen, sondern auch die freien 3'-OH Enden von Einzelstrangbrüchen der DNA markiert werden, wie sie z.B. bei Reparaturprozessen vorkommen (Kanoh et al. 1999). Eine ähnlich kritische Arbeit über die Spezifität der Fragmentationsassays wurde von Ohno et al. verfasst. Sie kommt zu dem Schluss, dass die markierten Kardiomyozyten nicht als apoptotisch zu bezeichnen sind, da in ihnen zwar DNA-Fragmentationen nachweisbar waren, sie aber ultrastrukturell Zeichen der Nekrose und nicht der Apoptose aufzeigten (Ohno et al. 1998). Die Ergebnisse von Kanoh und Ohno werden jedoch von einer Vielzahl von anderen Autoren angezweifelt oder zumindest kritisch gesehen. Sie führen diese Ergebnisse auf eine zu geringe Standardisierung der Tests im Labor, auf methodische Fehler (z.B. eine zu geringe Anzahl der untersuchten Zellen), oder auf eine falsche Interpretation der Ergebnisse der Tests zurück (Hegyí und Skepper 2000, Saraste et al. 2000).

Die Markierung von DNA-Fragmentation durch TUNEL oder ISEL ist die am häufigsten verwendete, aber auch die am meisten kritisierte Methode zum Nachweis von Apoptose in Zellen (Dispersyn und Borgers 2001).

### 6.3.2 Expressionsrate von Tissue Transglutaminase

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eine unspezifische Anfärbung von Synthese- und/oder Reparaturprozessen mit der ISEL-Methode zu verringern, wurde das apoptosetypische Enzym Tissue Transglutaminase in den konsekutiven Folgeschnitten untersucht.

Die Expression bzw. die gesteigerte Aktivität der tTG repräsentiert eine wichtige Schlüsselstelle in der Apoptosekaskade (Fesus et al. 1996, Song et al. 2003). Sie vermittelt die schon in der Einleitung beschriebene Quervernetzung von Proteinen zu einem stabilen Gerüst, welches die Freisetzung von intrazellulären Bestandteilen verhindert. Sie ist damit für die beim programmierten Zelltod typischerweise nur gering ausgeprägte Entzündungsreaktion hauptverantwortlich (Piredda et al. 1997, Melino und Piacentini 1998, Amendola et al. 2002). Eine sehr enge Korrelation zwischen der gesteigerten Expression von tTG und Apoptose konnte in einer Vielzahl von unterschiedlichen Studien für unterschiedliche Zellen und Versuchsmodelle nachgewiesen werden (De Laurenzi und Melino 2001).

Ob tTG bei allen apoptotischen Zelluntergängen exprimiert wird, oder ob tTG nicht zwingend beteiligt sein muss, untersuchten Grabarek et al. 2002 in einer Arbeit an humanen Leukämiezelllinien. Apoptose ohne messbare Aktivität von tTG konnte unter experimentellen Bedingungen von ihnen nur durch eine sehr schnelle Induktion der Apoptose durch hochdosierte Zellgifte nachgewiesen werden. Die Zellkulturen in allen anderen Versuchsmodellen zeigten eine deutliche Aktivität der tTG (Grabarek et al. 2002).

Volokhina et al. untersuchten die Wertigkeit von tTG als Marker bei künstlich induzierter Apoptose in humanen Brustkrebszelllinien. Sie zeigten einen signifikanten Zusammenhang von gesteigerter tTG-Expression und Apoptoseinduktion und kommen zu dem Schluss, dass sich tTG sehr gut als Apoptosemarker *in vitro* und *ex vivo* eignet (Volokhina et al. 2003). Auch Rittmaster et al. kommen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebniss, dass die morphometrisch ermittelte Expressionsrate von tTG einen hervorragender Marker für apoptotische Zellen darstellt (Rittmaster et al. 1999).

In einer Untersuchung an Dünndarmepithelzellen zeigten auch Aschoff et al. durch Kolokalisationsstudien, dass die tTG sehr gut zur Untersuchung von Apoptose in Geweben geeignet ist. Sie konnten nachweisen, dass sich tTG nur in Zellen finden lässt, die einen Nachweis von DNA-Strangbrüchen und eine apoptosetypische Morphologie aufweisen. In Zellen ohne Fragmentationsnachweis oder in Zellen mit positiver ISEL-Reaktion, aber normaler Morphologie konnten sie keine tTG-Expression finden (Aschoff et al. 2000). Darauf

aufbauend zeigte Busch 2002 in seiner Promotionsarbeit, dass die Expression von tTG auch im Myokard an eine Fragmentation der Kern-DNA gebunden ist. So konnte in Kardiomyozyten ohne Fragmentationen im Zellkern kein tTG nachgewiesen werden. Umgekehrt zeigten alle Zellen mit positivem Nachweis von tTG auch eine positive ISEL-Reaktion. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Zellen mit tTG-Expression zeigten sich auch ultrastrukturell apoptosespezifische Befunde wie z.B. Chromatinkondensation, Membranblebbing und Zellschrumpfung, Hinweise auf nekrotische Vorgänge bei positiver ISEL-Reaktion konnten nicht gefunden werden (Busch 2002). Auch Lotze et al. konnten in einer Arbeit über dilatative Kardiomyopathien die gute Verwendbarkeit der Kombination von tTG und ISEL als Marker für Apoptose bestätigen (Lotze et al. 2001).

Sowohl die DNA-Fragmentation als auch die Expression von tTG gelten als ein relativ spätes Ereignis in der Apoptosekaskade. Sie werden nicht mehr durch die Regulationsmechanismen der Proteine aus der Bcl-2 Familie beeinflusst und stehen in der ablaufenden Kaskade hinter den Caspasen, so dass beim Auftreten beider Ereignisse der Übergang in die irreversible Apoptose als wahrscheinlich und damit die Zelle als apoptotisch anzusehen ist (Piacentini et al. 1991b, Melino et al. 1994, Anselmi et al. 2004).

Die Zuverlässigkeit der in dieser Arbeit verwendeten histologischen Marker ist, wie oben beschrieben, in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen. Darüber hinaus korrelieren die beiden Marker mit  $r_{sp} = 0,749$  sehr gut positiv miteinander. Es zeigten sich in der statistischen Auswertung keinerlei Ausreißer, färbetechnische oder methodische Fehler sind deshalb nicht anzunehmen (s. Abb. 5.6).

### 6.3.3 Visualisierung mit Peroxidase anti-Peroxidase (PaP)

Bei Immunperoxidase-Verfahren wird neben den Antikörpern gegen das Gewebsantigen auch das Enzym Peroxidase verwendet. Die Anwendung von Peroxidase bietet folgende Vorteile:

- Es ist klein und behindert nicht die Bindung von Antikörpern an benachbarten Stellen.
- Es ist leicht in hochgereinigter Form erhältlich, wodurch die Kontaminationsgefahr verringert ist.
- Peroxidase ist sehr stabil und bleibt daher während der Herstellung, Aufbewahrung und der Verarbeitung unverändert.

- Nur kleine Mengen Peroxidase sind im Gewebe vorhanden, diese endogene Aktivität kann jedoch leicht unterdrückt werden (z.B. durch so genanntes „Normalserum“).
- Es gibt eine Vielzahl an Chromogenen, die mit Peroxidase ein Farbprodukt bilden
- Peroxidase ist billig (Bourne 1997).

Die Anfärbung mit der PaP-Methode gilt als sehr empfindlich, besonders in formalinfixiertem Gewebe, darüber hinaus ist es ein sehr gut etabliertes und einfach durchzuführendes Verfahren (Bourne 1997).

## 6.4 Interpretation der Ergebnisse

Als Vorbemerkung ist zu erwähnen, dass die exakten Mechanismen der Apoptoseinduktion in Herzmuskelzellen nicht abschließend geklärt sind und die Interpretation der veröffentlichten Studien durch die Vielzahl von unterschiedlichen Versuchsmodellen bzw. -tieren, Methoden zur Apoptosebestimmung und deren Schlussfolgerungen erschwert ist (van Heerde et al. 2000, Krijnen et al. 2002, Hughes 2003).

In der Kardiochirurgie werden kaliumreiche Lösungen standardmäßig zur Erzeugung eines elektiven Herzstillstandes eingesetzt. Durch sie wird die Zellmembran der Kardiomyozyten sehr schnell depolarisiert und es resultiert ein elektromechanischer Stillstand, der den Energieverbrauch der Zellen während der Ischämiephase stark reduziert (Yamazaki et al. 2004). Die Dauer des Herzstillstandes und der danach folgenden Reperusionszeit ist positiv mit dem Ausmaß der Herzmuskelschädigung korreliert (Schmitt et al. 2002). Dabei scheint auch die Apoptose eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Apoptose schon frühzeitig nach Herzoperationen nachweisbar ist und der Grad der Apoptose negativ mit der Myokardfunktion korreliert (Aebert et al. 2000, Schmitt et al. 2002).

### 6.4.1 Diskussion der histologischen Auswertung

Bei der Auswertung der Myokardbiopsien zeigte sich eine hohe Ausgangsrate an Herzmuskelzellen mit positivem Apoptosenachweis zu Beginn der Versuche in allen drei hier ausgewerteten Versuchsgruppen. Auch in zwei weiteren, in dieser Arbeit nicht diskutierten Gruppen aus der gesamten Versuchsreihe zeigte sich ebenfalls eine ähnlich hohe Apoptoserate vor dem kardioplegischen Herzstillstand (Rahmanian et al. 2005). Eine Ursache

könnte sein, dass Erkrankungen wie z.B ein latenter viraler Infekt die erhöhte Apoptoserate bei den Versuchstieren ausgelöst hat. So ist bekannt, dass Viren in ihren Wirtszellen die Apoptosekaskade an zentralen Schlüsselstellen in Gang bringen können, um die Immunantwort des Wirtes zu beeinflussen. Unter anderem bei Polioviren und den bei Herzerkrankungen häufig vorkommenden Cocksackieviren konnte nachgewiesen werden, dass sie die Caspase 3 direkt aktivieren können und somit die Zelle zum apoptotischen Untergang zwingen können (Carthy et al. 1998, Lopez-Guerrero et al. 2000). Dies erklärt jedoch nicht, warum in allen Versuchsgruppen eine erhöhte Rate gefunden wurde. Es ist auch nicht anzunehmen, dass alle Tiere in allen Gruppen über einen solch langen Zeitraum verteilt mit apoptoseinduzierenden Viren infiziert waren. Außerdem zeigten die Tiere keinerlei klinische Anzeichen für eine Infektion. Möglich wäre aber auch der Einfluss von präoperativem Stress durch Haltung bzw. die Narkoseeinleitung. Zusätzlich kommt der Stress durch den operativen Eingriff selbst als Auslöser in Frage. Versuchsbedingt konnten die Ausgangsbiopsien nicht zu einem richtigen Nullpunkt ohne Einfluss von Stress für das Tier, sondern erst mehrere Stunden nach Beginn des Versuches entnommen werden. Da das operative Management und die zeitliche Abfolge bei allen Gruppen in etwa identisch gewesen ist, könnte dies auch die bei allen Gruppen bestimmten relativ hohen Werte zum Zeitpunkt 1 erklären.

Weiterhin auffällig ist, dass sich die Gruppe 1 zum Zeitpunkt 1 in der Anzahl der ISEL-positiven Zellen mit  $p \leq 0,001$  (Gruppen 1 und 2) und mit  $p = 0,03$  (Gruppen 1 und 3) statistisch sicher von den anderen unterschieden hat. Auch weisen die Tiere der Gruppe 1 eine signifikant erhöhte Expressionsrate von tTG vor Beginn des kardioplegischen Herzstillstandes auf (Gruppe 1 vs. Gruppe 2  $p = 0,05$ ). Die gemessenen tTG Werte bleiben im Versuchsverlauf konstant, aber nicht signifikant, über den Expressionsraten der anderen beiden Gruppen. Warum die Tiere der Gruppe 1 im Vergleich zu den anderen Gruppen eine konstant erhöhte Rate an den gemessenen Apoptosemarkern aufwiesen, kann zur Zeit nicht erklärt werden.

Es konnten darüber hinaus in dieser Arbeit weder signifikante Unterschiede zwischen den Apoptoseraten der beiden Kardioplegieverfahren noch im Zeitverlauf des Versuches bezogen auf den Ausgangswert festgestellt werden. Auch konnte kein sicherer Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe ermittelt werden. Es zeigte sich nur einmal ein Unterschied der bestimmten myokardialen Apoptose zwischen der Versuchsgruppe 1, mit der retrograden Kardioplegie nach Buckberg, und der Kontrollgruppe ohne kardioplegischen Herzstillstand. Dabei handelte es sich jedoch um eine Verringerung der Anzahl der ISEL-

positiven Zellen unter den Ausgangswert. Wie es zu dieser starken Abnahme der Doppelstrangbrüche zum Ende des Versuches kommen konnte, ist nicht eindeutig zu erklären. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass entweder die Kardioplegielösungen keinen Einfluss auf das Entstehen von Apoptose im Herzmuskel haben, oder dass das Zeitfenster von 6 Stunden nach Reperfusionseende zu kurz ist und deshalb keine unterschiedlichen Apoptoseraten gemessen werden konnten. Eine Aussage über den Langzeitverlauf über Tage und Monate ist nicht möglich, und es bleibt somit unklar, ob nicht doch eine Beeinflussung besteht. Ein Versagen der histologischen Marker ist, wie oben bereits diskutiert, nicht anzunehmen.

Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls keine Unterschiede bei den Raten an apoptotischen Zellen nach Kardioplegiegabe finden. So untersuchten z.B. Vazquez-Jimenez et al. die Auswirkungen von tief hypothermen und hypothermen Kardioplegielösungen auf den Herzmuskel. Hierbei konnten keine Unterschiede bei der Apoptoseinduktion ermittelt werden (Vazquez-Jimenez et al. 2001). Auch Qing et al. konnten keine Unterschiede bei der Induktion von apoptoseregulierenden Proteinen und der Anzahl an apoptotischen Zellen nachweisen (Qing et al. 2002). In einer Studie an Hunden fanden Yeh und Kollegen keinen Unterschied in der Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten zwischen einer reinen EKZ Gruppe und der Versuchsgruppe mit einer Applikation von moderat hypothermer (28 °C) Blukardioplegie (Yeh et al. 2003).

Hammel et al. fanden in ihren Studien an neugeborenen Lämmern zwar eine erhöhte Rate an apoptosepositiven Zellen nach Gabe von tief hypothermer kristalloiden Kardioplegielösung. Wie die Autoren jedoch selber anmerken, sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt gültig, da sich neugeborene Lämmer in einem stark proapoptotischen Zustand befinden und dort sehr sensibel auf Schädigungen reagieren und sehr leicht in die Apoptose übergehen.

Nur die Arbeitsgruppen um Scarabelli bzw. Feng gelangten in ihren Studien zu der Überzeugung, dass eine blutbasierte warme Kardioplegielösung zu einer starken Erhöhung der Apoptoserate führen kann (Scarabelli et al. 2004). Die Aussagekraft der Werte ist jedoch deutlich eingeschränkt, da die Biopsie schon 10 Minuten nach Wiedereröffnung der Aortenklammung entnommen wurde. Auch Feng et al. erreichen nur 30 Minuten Reperusionszeit (Feng et al. 2005). Auf die Problematik der Probenentnahme v.a. bei klinischen Studien, den Einfluss der Reperfusion und die nötige Dauer bis zu der Apoptoseinduktion im Myokard wurde weiter oben bereits ausführlich hingewiesen.

Neben den nicht nachweisbaren Unterschieden zwischen den beiden Kardioplegieverfahren scheint auch die Applikationsrichtung (antegrad vs. retrograd) keinen Einfluss auf die



Ausprägung der Apoptoserate zu besitzen. Bis jetzt fanden nur Vahasilta et al. einen Unterschied, dies jedoch bei nur 90 Minuten Reperfusion (Vahasilta et al. 2005). Denkbar wäre aber auch, dass Unterschiede existieren, diese aber durch einen möglichen Einfluss der Kardioplegielösungen wieder ausgeglichen wurden. Um diese Frage zu klären, wären weitere Studien mit entsprechenden Versuchsanordnungen nötig.

Die Ergebnisse der ISEL- bzw. der TUNEL-Technik sind insgesamt recht schwierig zu interpretieren bzw. zu vergleichen. So gibt es sehr große Unterschiede bei den Angaben zu der Höhe der bestimmten Rate an positiven Zellen (Hughes 2003). Die Angaben bei der terminalen Herzinsuffizienz schwanken z.B. zwischen 5 und 35 % bei Narula et al. und 0,23 % bei Olivetti et al. (Narula et al. 1996, Olivetti et al. 1997).

In Anbetracht der gemessenen Werte stellt sich zusätzlich die Frage, ob das Schwein an sich als Versuchsmodell für Apoptose in Herzmuskelzellen möglicherweise nicht geeignet ist. Zusätzlich bleibt unklar, in wie weit die Versuchsergebnisse auf den Menschen und die klinische Praxis übertragen werden können.

#### **6.4.2 Diskussion der Hämodynamik und der Laborparameter**

In der Gruppe mit der retrograden Blutkardioplegie nach Buckberg (1) zeigte sich in den ersten 3 Stunden nach der Ischämiezeit eine signifikant höhere Herzfrequenz als in den anderen beiden Gruppen. Auch zeigten sich in Gruppe 1 signifikant niedrigere arterielle Mitteldrücke als in der Kontrollgruppe. Für die IAWBC-Gruppe konnte kein Unterschied beim MAP nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine im Vergleich zur Calafioregruppe schlechtere Myokardprotektion hinweisen. Auch die signifikant erhöhten Laktatwerte in der ersten Stunde nach Beendigung der EKZ stützen diese Vermutung. Es zeigten sich auch, wie oben bereits erwähnt, in Gruppe 2 klinisch weniger Arrhythmien und die Reperfusionszeit mit Unterstützung der EKZ war kürzer. Bei den postischämischen pH-Werten unterscheiden sich die beiden Versuchsgruppen jedoch nicht. Sie lagen erwartungsgemäß deutlich unter den Werten der Kontrollgruppe ohne Ischämiezeit. Bei den anderen gemessenen Werten zeigten sich keine sicheren Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen von klinischen Studien wie z.B. von Franke et al., die signifikant niedrigere Werte für Ischämie marker, Zellschädigung und weniger Arrhythmien in der Gruppe mit IAWBC gegenüber der Gruppe mit Kardioplegie nach Buckberg nachweisen konnten (Franke et al. 2003). Auch andere Gruppen berichten von

deutlich weniger Arrhythmien nach IAWBC (Pelletier et al. 1994, Calafiore et al. 1995). Jedoch konnte auch in diesen beiden Studien und durch Jacquet et al. kein Unterschied im klinischen „outcome“, im Sinne einer schlechten Hämodynamik, und in der Mortalität gefunden werden (Jacquet et al. 2000, Franke et al. 2003).

#### 6.4.3 Zusammenhang von Apoptoserate und Hämodynamik

Um eine Aussage über einen möglichen Zusammenhang der Ausprägung der Apoptoserate und der Pumpfunktion des Herzens zu ermöglichen, wurde der *Cardiac Index* (CI) als Maß für die Herzfunktion mit den bestimmten Werten der Apoptosemarker korreliert (Abb. 6.2 und 6.3). Dabei wurde der dem Zeitpunkt der jeweiligen Probenentnahme entsprechende gemessene *Cardiac Index* verwendet. Es fand sich für beide untersuchten Marker lediglich eine leichte Tendenz zur negativen Korrelation mit der Herz-Kreislauf-Funktion mit  $r_{sp} = -0,153$  für die Expressionsrate der tTG und  $r_{sp} = -0,122$  für den Anteil der ISEL-positiven Zellen (Tab 6.1 und Tab. 6.2). Beide bestimmten Korrelationseffizienten sind zwar nicht signifikant, dies könnte jedoch trotzdem auf eine mögliche Beteiligung der Apoptose an dem postoperativen myokardialen Funktionsverlust hindeuten.

Die Messung des HZV bzw. die Berechnung des *Cardiac Index* ist strenggenommen nicht ein Maß für die Funktion des gesamten Myokards, sondern nur für die linksventrikuläre Kontraktilität. Da aber die Apoptose den ganzen Herzmuskel betreffen müsste, ist die Aussagefähigkeit der HZV-Messung für den Zusammenhang mit der Apoptoserate nur eingeschränkt. Andererseits konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede bezüglich der Apoptoserate zwischen rechtem und linkem Ventrikel bzw. dem rechten Vorhof gefunden werden, so dass die über die HZV-Messung ermittelte linksventrikuläre Pumpleistung höchst wahrscheinlich als repräsentativ für die gesamte myokardiale Funktion anzusehen ist.

**Tab. 6.1:** Korrelation des CI und der tTG-Expressionsrate

Gruppe	1	2	3	gesamt
Korrelation $r_{sp}$	- 0,452	- 0,269	- 0,041	- 0,153

**Tab. 6.2:** Korrelation des CI und der Rate der ISEL-positiven Zellen

Gruppe	1	2	3	gesamt
Korrelation $r_{sp}$	- 0,174	- 0,264	- 0,161	- 0,122

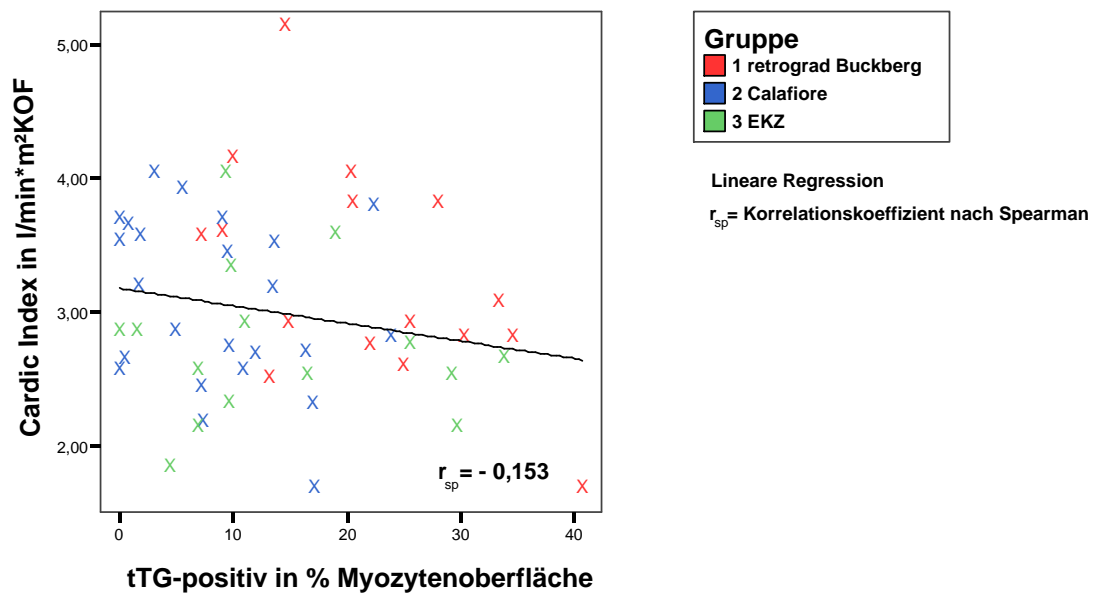


Abb. 6.2: Korrelation von Herzfunktion und tTG-Expressionsrate

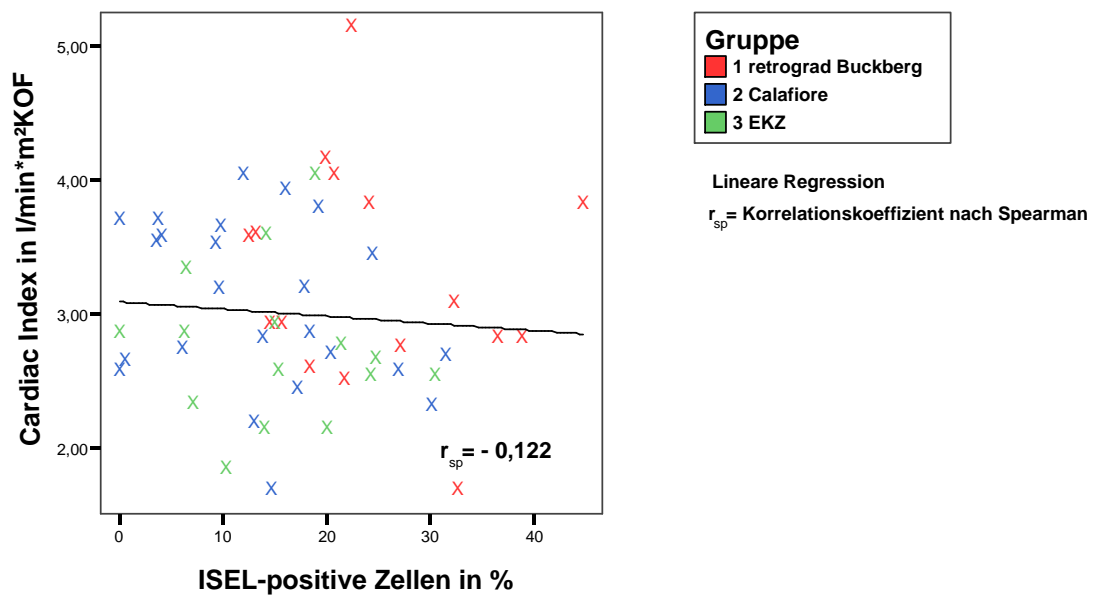


Abb. 6.3: Korrelation von Herzfunktion und Rate der ISEL-positiven Zellen

Die Ausprägung der Apoptose stellt eine elegante mögliche Erklärung für die postoperative Hämodynamikeinschränkung, dem so genannten „*stunning*“, dar (Anselmi et al. 2004). Es ist bekannt, dass z.B. die aktivierten Caspasen kontraktile Proteine in Herzmuskelzellen als Substrat spalten können und so möglicherweise zu einer verschlechterten Ventrikelfunktion führen (Communal et al. 2002).

Einige Studien konnten einen umgekehrten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Apoptose und der Kontraktilität des Herzmuskels nachweisen (Aebert et al. 2000, Schmitt et al. 2002). Busch fand in seinen Untersuchungen bei Enterovirus-assoziierte dilatative Kardiomyopathie, ähnlich dieser Arbeit, nur einer leichten Tendenz zur Abhängigkeit der Herzfunktion von der Apoptoserate (Busch 2002). Koda et al. kommen dagegen zu dem Schluss, dass die Anzahl der TUNEL-positiven Kardiomyozyten bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zwar mit dem Ausmaß der Herzmuskelhypertrophie und der Myozytengröße korreliert, aber nicht mit Parametern der Pumpfunktion (Koda et al. 2003). Bei kardiochirurgischen Operationen bleibt der Einfluss der Apoptose auf die Hämodynamik ebenfalls umstritten, so fanden Wu et al., im Gegensatz zu den Gruppen um Aebert bzw. Schmitt, keinen Zusammenhang zwischen postoperativer kardialer Funktionseinschränkung und der bestimmten Apoptoserate (Wu et al. 2003).

Auch bei der Hämodynamik ist, wie bei der histologischen Auswertung, durch das nur kurze Zeitfenster von sechs Stunden keine zuverlässige Aussage über den Langzeitverlauf von Tagen, Wochen oder sogar Monaten nach einem Eingriff mit elektivem Herzstillstand möglich. Eine langfristige Beeinflussung der Herzleistung durch die Apoptoserate ist somit trotz der oben diskutierten Ergebnisse letztendlich nicht auszuschließen und es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Frage zu beantworten.

In einer Vielzahl von Studien konnte demonstriert werden, dass blutbasierte Kardioplegielösungen den myokardialen Stoffwechsel und damit die Funktion besser als kristalloide Lösungen protektieren können (Chang et al. 1997). Dies könnte den in dieser Arbeit nicht nachweisbarem Einfluss auf die Apoptoserate durch blutbasierte Kardioplegielösungen erklären. Eine verbesserte metabolische Situation in den Myozyten durch die besseren protektiven Eigenschaften könnte auch in einer geringeren oder sogar unveränderten Apoptoseinduktion resultieren. In dieser Arbeit wurden jedoch keine kristalloiden Kardioplegielösungen im Vergleich verwendet, so dass deren Einfluss auf die Apoptose in dem hier verwendeten Versuchsmodell nicht beurteilt werden kann.

Bezogen auf den Aspekt der Auswahl einer geeigneten Kardioplegielösung und der Bestimmung ihrer protektiven Eigenschaften scheint die Apoptoseinduktion, zumindest bei den hier verwendeten Kardioplegielösungen, kein geeigneter Parameter zu sein. Da sie sich in diesem Punkt nicht unterscheiden, sollten andere Eigenschaften zur Auswahl der geeignetsten Myokardprotektion herangezogen werden.

## 7. Schlussfolgerungen

Die Ursachen der in der postoperativen Phase regelmäßig verminderten Herzfunktion sind bis heute nicht ausreichend geklärt. Die Idee, dass die Apoptose in den Herzmuskelzellen zu einem signifikanten Zellverlust führen kann, der wiederum für die postoperative Leistungsverminderung verantwortlich ist, ist eine interessante mögliche Antwort auf diese Frage (Anselmi et al. 2004).

In der hier vorliegenden Studie wurde deswegen untersucht, ob Kardioplegielösungen einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion nach prolongierter Ischämie haben und ob sich diese auf die postoperative Hämodynamik auswirkt.

Einen Einfluss der beiden hier verwendeten Kardioplegielösungen auf die Apoptoserate konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden. Es zeigten sich weder Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, noch zeigte sich ein Unterschied zu der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse belegen, dass keine der beiden hier verwendeten Kardioplegielösungen einen Einfluss auf die Apoptoserate im Myokard nach prolongierter Ischämie besitzt. Auch scheint die Applikationsrichtung keine Auswirkungen zu haben. Letztendlich lässt sich aber nicht ausschließen, dass das Zeitintervall zwischen Schädigung und letzter Probenentnahme zu kurz gewählt wurde und deswegen keine Auswirkungen gemessen werden konnten.

Es zeigte sich, dass die Ausprägung der hier verwendeten Apoptoseparameter tTG und ISEL zumindest im Schwein einer sehr hohen Variabilität unterliegt. So wurden sowohl für den Zeitpunkt vor Beginn der Versuche unerwartet erhöhte Werte der Marker gemessen, als auch sehr stark unterschiedliche Raten bestimmt. Dies legt nahe, dass die Apoptoseinduktion im Schwein nur sehr kritisch zu beurteilen ist. Es stellt sich also die Frage, ob das Schwein als Versuchsmodell für Apoptosestudien überhaupt geeignet ist. Darüber hinaus ist unklar, wie gut die Ergebnisse aus einem Schweinmodell auf die Zustände beim Menschen übertragbar sind. Zur Klärung dieser Fragen sind weitere Untersuchungen an anderen Tierspezies bzw. - soweit möglich - am Menschen notwendig.

In der Gruppe mit der retrograden Kardioplegie nach Buckberg zeigten sich signifikant höhere Herzfrequenzen und niedrigere arterielle Mitteldrücke, sowie ein signifikant erhöhter Laktatwert nach der Ischämiezeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Gruppe mit der Kardioplegie nach Calafiore (IAWBC) zeigte keine Unterschiede. Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche bessere Kardioprotektion der IAWBC hin, insgesamt konnten jedoch keine Unterschiede in der Hämodynamik, bezogen auf den *Cardiac Index*, festgestellt werden.

Des weiteren wurden für die hier als Versuchsmodell verwendeten Schweine keine Hinweise auf einen signifikanten Zusammenhang der Apoptoserate und der postoperativen Hämodynamik nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden hier verabreichten Kardioplegielösungen bzw. Applikationsverfahren, bezogen auf ihre Protektion der Kardiomyozyten und das hier untersuchte Zeitintervall, gleichwertig sind und keinen Einfluss auf die Apoptoserate im Schweineherzen oder die Hämodynamik haben. Es stellt sich dennoch die Frage, ob nicht zumindest langfristig Unterschiede zwischen den beiden Verfahren bestehen könnten. Hierzu wären weiterführende Langzeitstudien über Tage und Wochen oder sogar Monate erforderlich.

Trotz der hier dargestellten Ergebnisse bleibt die potentielle Beeinflussbarkeit der Apoptose durch die mittlerweile zahlreich beschriebenen spezifischen Inhibitoren, die z.B. auf der Ebene der Caspasen, der TNF-Rezeptoren oder der Bcl<sub>2</sub>-Proteine in die Kaskade eingreifen können, eine sehr spannende Fragestellung (Reed 2001, Fischer und Schulze-Osthoff 2005a, Fischer und Schulze-Osthoff 2005b). Diese Möglichkeit könnte nicht nur am Herzen, sondern auch für die Behandlung der Vielzahl an anderen apoptoseassoziierten Krankheiten eine therapeutische Rolle spielen. Dadurch stellt sich jedoch zwangsläufig auch die Frage, wie diese Wirkstoffe spezifisch an ihren Bestimmungsort gelangen sollen, ohne gravierende Nebenwirkungen zu erzeugen. Ein so ubiquitär in praktisch allen Zellen ablaufender Prozess, wie die Apoptose, wird nur sehr schwer zu beeinflussen sein.

Bei allen therapeutischen Hoffnungen darf man jedoch letzten Endes nicht vergessen, dass die Apoptose einen Schutzmechanismus darstellt, der durch die Elimination von Zellen, die auch eventuell eine Gefahr bedeuten können, die Integrität des Organs aufrechterhalten soll. Wird in diese Regulationsmechanismen eingegriffen, sind die langfristigen Folgen für das betroffene Organ nicht überschaubar, und es bleibt offen, ob ein Überleben der Zelle auch in einer Aufrechterhaltung ihrer Funktion resultiert (Dispersyn und Borgers 2001, Fischer und Schulze-Osthoff 2005a).

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Aebert H, Cornelius T, Birnbaum DE, Siegel AV, Riegger GA, Schunkert H. 1997a.

Induction of early immediate genes and programmed cell death following cardioplegic arrest in human hearts. *Eur J Cardiothorac Surg*, 12 (2):261-267.

Aebert H, Cornelius T, Ehr T, Holmer SR, Birnbaum DE, Riegger GA, Schunkert H. 1997b.

Expression of immediate early genes after cardioplegic arrest and reperfusion. *Ann Thorac Surg*, 63 (6):1669-1675.

Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreesen R, Eissner G. 2000.

Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*, 18 (5):589-593.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Hrsg. 2004. *Molekularbiologie der Zelle*. Vierte Aufl. Weinheim: WILEY-VCH Verlag.

Amendola A, Fesus L, Piacentini M, Szondy Z. 2002. "Tissue" transglutaminase in AIDS. *J Immunol Methods*, 265 (1-2):145-159.

Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. 1993. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *Am J Pathol*, 170 (1):1-8.

Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, Gaudino M. 2004.

Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25 (3):304-311.

Anversa P. 2000. Myocyte death in the pathological heart. *Circ Res*, 86 (2):121-124.



- Aschoff A, Jantz M, Jirikowski GF. 1996. In-situ end labelling with bromodeoxyuridine--an advanced technique for the visualization of apoptotic cells in histological specimens. *Horm Metab Res*, 28 (7):311-314.
- Aschoff AP, Gunther E, Jirikowski GF. 2000. Tissue transglutaminase in the small intestine of the mouse as a marker for apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation. *Histochem Cell Biol*, 113 (4):313-317.
- Autuori F, Farrace MG, Oliverio S, Piredda L, Piacentini M. 1998. "Tissue" transglutaminase and apoptosis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 62:129-136.
- Bachmaier K, Pummerer C, Kozieradzki I, Pfeffer K, Mak TW, Neu N, Penninger JM. 1997. Low-molecular-weight tumor necrosis factor receptor p55 controls induction of autoimmune heart disease. *Circulation*, 95 (3):655-661.
- Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. 1950. Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg*, 132 (5):849-866.
- Boehm JE, Singh U, Combs C, Antonyak MA, Cerione RA. 2002. Tissue transglutaminase protects against apoptosis by modifying the tumor suppressor protein p110 Rb. *J Biol Chem*, 277 (23):20127-20130.
- Bourne JA. 1997. *Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden*. Zweite Aufl. Hamburg: DAKO Diagnostika GmbH.
- Braimbridge MV, Chayen J, Bitensky L, Hearse DJ, Jynge P, Cankovic-Darracott S. 1977. Cold cardioplegia or continuous coronary perfusion? Report on preliminary clinical experience as assessed cytochemically. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 74 (6):900-906.
- Brandes H, Albes JM, Beinhauer H, Jirikowski G, Wahlers T. 2003. Apoptotic changes are integral part of the myocardial damage following cardioplegia and prolonged ischemia during cardiopulmonary bypass. *Thorac Cardiovasc Surg*, 51 (Suppl 1):102.

- Bretschneider HJ, Hubner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. 1975. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 16 (3):241-260.
- Brukhonenko SS, Terebinsky S. 1929. Experience avec la tete isole du chien, techniques et conditiones des experiences. *J Physiol Pathol Genet*, 27:31.
- Buckberg GD. 1979. A proposed "solution" to the cardioplegic controversy. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 77 (6):803-815.
- Busch HJ. 2002. Apoptosemarker in Kardiomyozyten; Eine immunhistochemische Studie an Myokardbiopsien von Patienten mit Enterovirus-assoziiierter dilatativer Kardiomyopathie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Calafiore AM, Teodori G, Di Giammarco G, Bosco G, Mezzetti A, Lapenna D, Verna AM. 1994. Intermittent antegrade cardioplegia: warm blood vs cold crystalloid. A clinical study. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 35 (6 Suppl 1):179-184.
- Calafiore AM, Teodori G, Mezzetti A, Bosco G, Verna AM, Di Giammarco G, Lapenna D. 1995. Intermittent antegrade warm blood cardioplegia. *Ann Thorac Surg*, 59 (2):398-402.
- Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, Anderson DR, Wilson JE, Yanh D, Hunt DWC, McManus BM. 1998. Caspase activation and specific cleavage of substrates after Cocksackievirus B3-induced cythopathic effect in HeLa cells. *J Virol*, 72:7669-7675.
- Chang CH, Lin PJ, Chu Y, Lee YS. 1997. Impaired endothelium dependent relaxation after cardiac global ischemia and reperfusion: role of warm blood cardioplegia. *J Am Coll Cardiol*, 29:681-687.
- Cohen G, Borger MA, Weisel RD, Rao V. 1999. Intraoperative myocardial protection: current trends and future perspectives. *Ann Thorac Surg*, 68 (5):1995-2001.

- Cohn LH. 2003. Fifty years of open-heart surgery. *Circulation*, 107 (17):2168-2170.
- Communal C, Sumandea M, de Tombe P, Narula J, Solaro RJ, Hajjar RJ. 2002. Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (9):6252-6256.
- De Laurenzi V, Melino G. 2001. Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol Cell Biol*, 21 (1):148-155.
- Didenko VV, Hornsby PJ. 1996. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J Cell Biol*, 135 (5):1369-1375.
- Dispersyn GD, Borgers M. 2001. Apoptosis in the heart: about programmed cell death and survival. *News Physiol Sci*, 16:41-47.
- Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol*, 151 (5):1205-1213.
- Edston E, Grontoft L, Johnsson J. 2002. TUNEL: a useful screening method in sudden cardiac death. *Int J Legal Med*, 116 (1):22-26.
- Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. 2004. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 61 (3):414-426.
- Eisel D, Fertig G, Fischer B, Manzow S, Moritz A, Schmeling K, Hrsg. 2000. Roche Molecular Biochemicals: Apoptosis and Cell Proliferation. Zweite Aufl. Mannheim: Roche Diagnostics GmbH.
- Faubel S, Edelstein CL. 2005. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 5 (3):269-287.

- Fedak PW. 1998. Open hearts. The origins of direct-vision intracardiac surgery. *Tex Heart Inst J*, 25 (2):100-111.
- Feng J, Bianchi C, Sandmeyer JL, Li J, Sellke FW. 2005. Molecular indices of apoptosis after intermittent blood and crystalloid cardioplegia. *Circulation*, 112 (9 Suppl):I184-189.
- Fesus L, Piacentini M. 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 27 (10):534-539.
- Fesus L, Thomazy V, Falus A. 1987. Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. *FEBS Lett*, 224 (1):104-108.
- Fesus L, Madi A, Balajthy Z, Nemes Z, Szondy Z. 1996. Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*, 52 (10-11):942-949.
- Feuerstein GZ, Young PR. 2000. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res*, 45 (3):560-569.
- Fischer U, Schulze-Osthoff K. 2005a. New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*, 57 (2):187-215.
- Fischer U, Schulze-Osthoff K. 2005b. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 1:942-961.
- Fischer UM, Klass O, Stock U, Easo J, Geissler HJ, Fischer JH, Bloch W, Mehlhorn U. 2003. Cardioplegic arrest induces apoptosis signal-pathway in myocardial endothelial cells and cardiac myocytes. *Eur J Cardiothorac Surg*, 23 (6):984-990.
- Flemming W. 1885. Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugetiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel. *Anarch Anat Entw Gesch*:221-244.

- Follette DM, Steed DL, Foglia R, Fey K, Buckberg GD. 1978. Advantages of intermittent blood cardioplegia over intermittent ischemia during prolonged hypothermic aortic clamping. *Circulation*, 58 (3 Pt 2):I200-209.
- Fou AA. 1997. John H. Gibbon. The first 20 years of the heart-lung machine. *Tex Heart Inst J*, 24 (1):1-8.
- Franke UF, Korsch S, Wittwer T, Albes JM, Wippermann J, Kaluza M, Rahmanian PB, Wahlers T. 2003. Intermittent antegrade warm myocardial protection compared to intermittent cold blood cardioplegia in elective coronary surgery--do we have to change? *Eur J Cardiothorac Surg*, 23 (3):341-346.
- Freude B, Masters TN, Kostin S, Robicsek F, Schaper J. 1998. Cardiomyocyte apoptosis in acute and chronic conditions. *Basic Res Cardiol*, 93 (2):85-89.
- Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenz-Meyer S, Schaper J. 2000. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 32 (2):197-208.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119 (3):493-501.
- Gibbon JH. 1954. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med*, 37:171-180.
- Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H. 1994. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. *Lab Invest*, 71 (2):219-125.
- Gottlieb RA. 2003. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol*, 98 (4):242-249.

- Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. 1994. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*, 94 (4):1621-1628.
- Grabarek J, Ardelt B, Kunicki J, Darzynkiewicz Z. 2002. Detection of *in situ* activation of transglutaminase during apoptosis: correlation with the cell cycle phase by multiparameter flow and laser scanning cytometry. *Cytometry*, 49 (2):83-89.
- Hammel JM, Caldarone CA, Van Natta TL, Wang LX, Welke KF, Li W, Niles S, Barner E, Scholz TD, Behrendt DM, Segar JL. 2003. Myocardial apoptosis after cardioplegic arrest in the neonatal lamb. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 125 (6):1268-1275.
- Haunstetter A, Izumo S. 1998. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 82 (11):1111-1129.
- Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV. 1976. Cellular protection during myocardial ischemia: the development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation*, 54 (2):193-202.
- Hegyi L, Skepper JN. 2000. The significance of expression of proliferating cell nuclear antigen in the cardiovascular system: mitosis or DNA repair? *Circulation*, 101 (25):E239-240.
- Hessel EA, Edmunds LH. 2003. Extracorporeal Circulation: Perfusion Systems. In: Edmunds LH, Hrsg. *Cardiac Surgery in the Adult*. Zweite Aufl. New York: McGraw-Hill, 317-338.
- Hinescu ME. 2001. Cardiac apoptosis: from organ failure to allograft rejection. *J Cell Mol Med*, 5 (2):143-152.
- Hughes SE. 2003. Detection of apoptosis using *in situ* markers for DNA strand breaks in the failing human heart. Fact or epiphenomenon? *J Pathol*, 201:181-186.

- Hunter AL, Choy JC, Granville DJ. 2005. Detection of apoptosis in cardiovascular diseases. *Methods Mol Med*, 112:277-289.
- Isner JM, Kearney M, Bortmann S, Passeri J. 1995. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 91 (11):2703-2711.
- Jacobi C. 1895. Ein Beitrag zur Technik der künstlichen Durchblutung überlebender Organe. *Arch Exp Pathol*, 31:330.
- Jacquet L, Honore P, Beale R, Valadi D, Dion R, Goenen M. 2000. Cardiac function after intermittent antegrade warm blood cardioplegia: contribution of the double-indicator dilution technique. *Intensive Care Med*, 26 (6):686-692.
- James TN. 1994. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. From postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation*, 90 (1):556-573.
- James TN. 1998. The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis. *Coron Artery Dis*, 9:291-307.
- Kalmar P, Irrgang E. 1999. Cardiac surgery in Germany during 1998. A report by the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg*, 47 (4):260-263.
- Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. 1999. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*, 99 (21):2757-2764.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4):239-257.

- Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, de Meyer GRY. 1998. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, 152 (4):885-888.
- Koda M, Takemura G, Kanoh M. 2003. Myocytes positive for in situ markers for DNA breaks in hypertrophic, but neither failed nor dilated, human hearts. Manifestation of cardiac hypertrophy rather than failure. *J Pathol*, 199:229-236.
- Krijnen PA, Nijmeijer R, Meijer CJ, Visser CA, Hack CE, Niessen HW. 2002. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction. *J Clin Pathol*, 55 (11):801-811.
- Krukenkamp IB, Levitsky S. 1993. Myocardial protection and cardioplegia. *Curr Opin Cardiol*, 8 (2):305-310.
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science*, 311 (5762):847-851.
- Lockshin RA, Williams CM. 1965. Programmed cell death I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkworm. *J Insect Physiol*, 11:123-133.
- Lockshin RA, Zakeri Z. 2001. Programmed cell death and apoptosis: origin of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:545-550.
- Lopez-Guerrero JA, Alonso M, Martin-Belmonte F, Carrasco L. 2000. Poliovirus induces apoptosis in the human U937 promonocytic cell line. *Virology*, 272 (250-256)
- Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH. 2005. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*, 18 (6):335-350.
- Lotze U, Busch HJ, Aschoff A, Gluck B, Sigusch H, Jirikowski G, Stelzner A, Figulla HR. 2001. Damaged myocytes as detected by the colocalization of DNA fragmentation and



- tissue transglutaminase and their prognostic significance in enterovirus-associated dilated cardiomyopathy. *Eur J Clin Invest*, 31 (9):744-755.
- Maisch B. 1999. How cardiac cells die--necrosis, oncosis and apoptosis. *Herz*, 24 (3):181-188.
- Mangala LS, Mehta K. 2005. Tissue transglutaminase (TG2) in cancer biology. *Prog Exp Tumor Res*, 38:125-138.
- McClellan RO. 1968. Applications of swine in biomedical research. *Lab Anim Care*, 18 (1):120-126.
- McLean J. 1916. The thromboplastic action of cephalin. *Am J Physiol*, 41:250-257.
- Melino G, Piacentini M. 1998. 'Tissue' transglutaminase in cell death: a downstream or a multifunctional upstream effector? *FEBS Lett*, 430 (1-2):59-63.
- Melino G, Annicchiarico-Petruzzelli M, Piredda L, Candi E, Gentile V, Davies PJ, Piacentini M. 1994. Tissue transglutaminase and apoptosis: sense and antisense transfection studies with human neuroblastoma cells. *Mol Cell Biol*, 14 (10):6584-6596.
- Melrose DG, Dreyer B, Bentall HH, Baker JB. 1955. Elective cardiac arrest. *Lancet*, 269 (6879):21-22.
- Mentzer RM, Jahania MS, Lasley RD. 2003. Myocardial Protection. In: Edmunds LH, Hrsg. *Cardiac Surgery in the Adult*. Zweite Aufl. New York: McGraw-Hill, 413-438.
- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. 2003. A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration. *J Clin Invest*, 111 (10):1457-1459.
- Nagy L, Thomazy VA, Saydak MM, Stein JP, Davies PJ. 1997. The promoter of the mouse tissue transglutaminase gene directs tissue-specific, retinoid-regulated and apoptosis-linked expression. *Cell Death Differ*, 4 (7):534-547.

- Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, Im MJ, Graham RM. 1994. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science*, 264 (5165):1593-1596.
- Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. 1997. Apoptosis and the heart. *Chest*, 112 (5):1358-1362.
- Narula J, Haider N, Virmani R, Di Salvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA. 1996. Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med*, 335 (16):1182-1189.
- Nobelprize.org. 2002. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2002. <http://nobelprize.org/medicine/laureates/2002/index.html> (Eingesehen am 14. Juli 2005)
- Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. 1993. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J*, 12 (9):3679-3684.
- Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. 1998. "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation*, 98 (14):1422-1430.
- Oliverio S, Amendola A, Rodolfo C, Spinedi A, Piacentini M. 1999. Inhibition of "tissue" transglutaminase increases cell survival by preventing apoptosis. *J Biol Chem*, 274 (48):34123-34128.
- Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. 1997. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*, 336 (16):1131-1141.

- Otsuki Y, Li Z, Shibata MA. 2003. Apoptotic detection methods - from morphology to gene. *Progr Histochem Cytochem*, 38 (3):275-340.
- Ou H, Haendeler J, Aebly MR, Kelly LA, Cholewa BC, Koike G, Kwitek-Black A, Jacob HJ, Berk BC, Miano JM. 2000. Retinoic acid-induced tissue transglutaminase and apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 87 (10):881-887.
- Pastuszko P, Edie RN. 2004. John H. Gibbon, Jr., the inventor of the first successful heart-lung machine. *J Card Surg*, 19 (1):65-73.
- Pelletier LC, Carrier M, Leclerc Y, Cartier R, Wesolowska E, Solymoss BC. 1994. Intermittent antegrade warm versus cold blood cardioplegia: a prospective, randomized study. *Ann Thorac Surg*, 58 (1):41-48; discussion 48-49.
- Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G. 1991a. The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis). *Eur J Cell Biol*, 54 (2):246-254.
- Piacentini M, Autuori F, Dini L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Fesus L. 1991b. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation. *Cell Tissue Res*, 263 (2):227-235.
- Piredda L, Amendola A, Colizzi V, Davies PJ, Farrace MG, Fraziano M, Gentile V, Uray I, Piacentini M, Fesus L. 1997. Lack of 'tissue' transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: relationship to development of autoimmunity in MRLlpr/lpr mice. *Cell Death Differ*, 4 (7):463-472.
- Pistritto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri ES. 2002. Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ*, 9:995-1006.

- Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Schumacher K, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B, Minkenberg R, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. 2002. Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass increases intramyocardial synthesis of heat shock protein 72. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 124 (4):724-731.
- Rahmanian PB, Baumbach H, Becker L, Brandes H, Beinhauer H, Wahlers T. 2005. Comparison of crystalloid and blood cardioplegia and its influence on apoptosis after prolonged ischemia during cardiopulmonary bypass in large animal model. *Thorac Cardiovasc Surg*, 53 (Suppl 1:18)
- Reed JC. 2001. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med*, 7 (7):314-319.
- Reiche D, Hrsg. 1999. Roche Lexikon Medizin. Vierte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag.
- Riede UN. 2004. Störungen der Reizbeantwortung. In: Riede UN, Werner M, Schäfer HE, Hrsg. Allgemeine und spezielle Pathologie. Fünfte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 117-156.
- Rittmaster RS, Thomas LN, Wright AS, Murray SK, Carlson K, Douglas RC, Yung J, Messieh M, Bell D, Lazier CB. 1999. The utility of tissue transglutaminase as a marker of apoptosis during treatment and progression of prostate cancer. *J Urol*, 162 (6):2165-2169.
- Sabbah HN. 2000. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res*, 45 (3):704-712.
- Saraste A. 1999. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*, 24 (3):189-195.
- Saraste A, Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45 (3):528-537.

- Saraste A, Pulkki AS, Voipio-Pulkki LM. 2000. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 101 (25):E239.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. 1997. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation*, 95 (2):320-323.
- Scarabelli TM, Pasini E, Ferrari G, Ferrari M, Stephanou A, Lawrence K, Townsend P, Chen-Scarabelli C, Gitti G, Saravolatz L, Latchman D, Knight RA, Gardin JM. 2004. Warm blood cardioplegic arrest induces mitochondrial-mediated cardiomyocyte apoptosis associated with increased urocortin expression in viable cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 128 (3):364-371.
- Schmitt JP, Schroder J, Schunkert H, Birnbaum DE, Aebert H. 2002. Role of apoptosis in myocardial stunning after open heart surgery. *Ann Thorac Surg*, 73 (4):1229-1235.
- Schumann H. 2000. Mechanische Dehnung als Ursache der überlast-assoziierten Apoptose im terminal insuffizienten Myokard: potentielle klinische Bedeutung [Dissertation]. Halle-Wittenberg: Martin-Luther-Universität.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144 (2):281-292.
- Song L, Ma X, Li Y, Cui X, Wang X. 2003. Effects of nuclear translocation of tissue transglutaminase and the release of cytochrome C on hepatocyte apoptosis. *Chin Med J (Engl)*, 116 (5):742-746.
- Stadelmann C, Lassmann H. 2000. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res*, 301 (1):19-31.

- Stephenson LW. 2003. History of Cardiac Surgery. In: Edmunds LH, Hrsg. Cardiac Surgery in the Adult. Zweite Aufl. New York: McGraw-Hill, 3-29.
- Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsasser A, Schaper J. 2001. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 33 (5):983-994.
- Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. 2000. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res*, 45 (3):588-594.
- Takemura G, Fujiwara H. 2006. Morphological aspects of apoptosis in heart diseases. *J Cell Mol Med*, 10 (1):56-75.
- Thomazy V, Fesus L. 1989. Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 255 (1):215-224.
- Tucholski J, Johnson GV. 2002. Tissue transglutaminase differentially modulates apoptosis in a stimuli-dependent manner. *J Neurochem*, 81 (4):780-791.
- Vahasilta T, Saraste A, Kyto V, Malmberg M, Kiss J, Kentala E, Kallajoki M, Savunen T. 2005. Cardiomyocyte apoptosis after antegrade and retrograde cardioplegia. *Ann Thorac Surg*, 80 (6):2229-2234.
- van Heerde WL, Robert-Offerman S, Dumont E, Hofstra L, Doevendans PA, Smits JF, Daemen MJ, Reutelingsperger CP. 2000. Markers of apoptosis in cardiovascular tissues: focus on Annexin V. *Cardiovasc Res*, 45 (3):549-559.
- Vazquez-Jimenez JF, Qing M, Hermanns B, Klosterhalfen B, Woltje M, Chakupurakal R, Schumacher K, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. 2001. Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass reduces myocardial cell damage and myocardial cell death related to cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol*, 38 (4):1216-1223.


- Volokhina EB, Hulshof R, Haanen C, Vermes I. 2003. Tissue transglutaminase mRNA expression in apoptotic cell death. *Apoptosis*, 8 (6):673-679.
- von Frey M, Gruber M. 1885. Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe. Ein Respirationsapparat für isolierte Organe. *Virchows Arch Physiol*, 9:519.
- Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MD. 1996. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol*, 133:1053-1059.
- Wu ZK, Laurikka J, Saraste A, Kyto V, Pehkonen EJ, Savunen T, Tarkka MR. 2003. Cardiomyocyte apoptosis and ischemic preconditioning in open heart operations. *Ann Thorac Surg*, 76 (2):528-534.
- Wyllie AH. 1987. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*, 153 (4):313-316.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68:251-306.
- Yamazaki K, Miwa S, Ueda K, Tanaka S, Toyokuni S, Unimonh O, Nishimura K, Komeda M. 2004. Prevention of myocardial reperfusion injury by poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor, 3-aminobenzamide, in cardioplegic solution: in vitro study of isolated rat heart model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 26:270-275.
- Yeh CH, Wang YC, Wu YC, Chu JJ, Lin PJ. 2003. Continuous tepid blood cardioplegia can preserve coronary endothelium and ameliorate the occurrence of cardiomyocyte apoptosis. *Chest*, 123 (5):1647-1654.
- Zatloukal K, Roth J, Denk H. 2004. Zell- und Gewebsreaktionen. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, Hrsg. *Pathologie*. Dritte Aufl. München: Elsevier, 39-111.

Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. 2000. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*, 45 (3):651-660.



## 9. Anhang

### 9.1 Tierversuchsgenehmigung



**Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit  
und Verbraucherschutz**

Sitz Bad Langensalza

PSF 102116, 99021 Erfurt, Juri-Gagarin-Ring 124, 99084 Erfurt  
☎ 0361/37800, Fax 0361/3788801, eMail: tlw.erfurt@t-online.de

TLLV • Standort Weimar • PF 2249 • 99403 Weimar

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität  
Jena  
Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
PF  
07740 Jena

**Neue Amtsbezeichnung !**

Abteilung 1  
Gesundheitlicher Verbraucherschutz  
und Veterinärwesen  
Standort Weimar

Fachbereich 112  
Fachgebiet Tierschutz  
Bearbeiter: DVM Suhrke  
☎ 03643-587392 Fax 03643-587322  
E-Mail: ssuhrke@tlwva.thueringen.de

**Eingegangen**  
**23. Mai 2001**  
**Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie**  
**Sekretariat Prof. Wahlers**

Ihre Zeichen

Ihre Nachricht

Unsere Zeichen  
112.43-2684-04-02-06/01

Telefon

Datum  
22.05.01

nachrichtlich: Staatliches Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Jena  
Herrn Dr. Schubert, Tierschutzbeauftragter des Klinikums der FSU

Vollzug des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.98 (BGBl. I  
Nr. 30 vom 29.05.98 S. 1105, 1818)

hier: Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchs durch Herrn Prof. Dr. Wahlers,  
„Induktion und Ausprägung der Apoptose des Myozyten nach Kardioplegie und pro-  
longierter Ischämie am Großtiermodell“, Reg.-Nr. 02-06/01

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Wahlers,

hiermit wird Ihnen nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes die

**Genehmigung**

zur Durchführung von folgendem Tierversuch erteilt:

**„Induktion und Ausprägung der Apoptose des Myozyten nach Kardioplegie und  
prolongierter Ischämie am Großtiermodell“, Reg.-Nr. 02-06/01**

Für die Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen 45 Schweine verwendet werden.  
Im Tierversuch nicht verwendete Tiere dürfen nicht in einem anderen Tierversuch ohne Ge-  
nehmigung verwendet werden.  
Die Genehmigung wird bis 30.06.2004 erteilt.  
Dieser Bescheid ergeht gebührenfrei.

Der Leiter des Versuchsvorhabens, Herr Prof. Dr. Wahlers, sowie der stellvertretende Ver-  
suchsleiter, Herr Dr. Brandes, erfüllen die Voraussetzungen des § 8 Abs. 3 Nr. 2 des Tier-  
schutzgesetzes.

Besucher- und postalische Anschrift  
Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit  
und Verbraucherschutz – Standort Weimar  
Weimarplatz 4  
99423 Weimar

Seite 1 von 2  
☎ (03643) 587304 Telefax: (03643) 587305

Staatshauptkasse Thüringen  
Landeszentralbank Erfurt  
(BLZ 820 000 00) Kto.-Nr.: 820 015 00



2

Die Kennzeichnung der Käfige oder Einrichtungen, in denen die Versuchstiere gehalten werden, ist mit dem zuständigen Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt Jena (☎ 03641/418911, Herrn Dr. Zemke) zustimmen.

Die Genehmigung kann zurückgenommen bzw. widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen oder Auflagen nicht erfüllt werden oder die einschlägigen Vorschriften des Tierschutzgesetzes, hier insbesondere die Paragraphen 7-11 und 16c, nicht beachtet werden. Insbesondere wird auf die Meldung nach Versuchstiermeldeverordnung vom 04.11.1999 (BGBl. I Nr. 50 vom 12.11.1999 S. 2156) über die verwendeten Versuchstiere des vergangenen Jahres durch den Versuchsansteller oder Leiter der Einrichtung zum 31.03. eines jeden Jahres hingewiesen. Sich zwischenzeitlich ergebende Veränderungen hinsichtlich der im Antrag mitgeteilten Voraussetzungen bzw. Angaben sind unverzüglich der Genehmigungsbehörde anzuzeigen. Die Stellungnahme der beratenden Kommission nach § 15 Abs. 1 Tierschutzgesetz wurde am 07.05.2001 eingeholt.

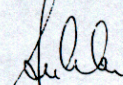
#### Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diese Entscheidung kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist schriftlich oder zur Niederschrift beim

Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz  
Fachbereich 112  
Weimarplatz 4  
99423 Weimar

einzulegen.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

  
Suhrke

## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben:
  1. Frau Dipl.-Biol. H. Beinhauer; bis 10/2004 Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, FSU Jena, jetzt Clondia chip technologies GmbH Jena
  2. Herr Dr. med. H. Brandes; bis 02/2004 Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, FSU Jena, jetzt Klinikum Salzgitter
  3. Herr Dr. med. P. Rahmanian; Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, FSU Jena
  4. Herr PD Dr. med. habil. Th. Wittwer, bis 10/2005 Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, FSU Jena, jetzt Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie , Klinikum der Universität zu Köln
  5. Herr Univ.-Prof. Dr. med. habil. Th. Wahlers; bis 10/2005 Direktor der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, FSU Jena, jetzt Direktor der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie , Klinikum der Universität zu Köln
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar, noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

### 9.3 Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Familienname	Becker
Vorname	Lars
Anschrift	Waldstr. 42, 64404 Bickenbach
Geboren am/in	17. Januar 1978 in Darmstadt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

#### Bildungsweg:

1984-1988	Hans-Quick-Schule, Bickenbach
1988-1994	Melibokusschule, Alsbach-Hähnlein
1994-1997	Schuldorf Bergstraße, Seeheim-Jugenheim; Abschluss mit Abitur

#### Zivildienst:

1997-1998	Deutsches-Rotes-Kreuz, Kreisverband Bergstraße/Heppenheim
-----------	--

#### Hochschulausbildung:

10/1998-12/2005	Studium der Humanmedizin an der FSU Jena
09/2000	Ärztliche Vorprüfung
08/2001	1. Staatsexamen
09/2003	2. Staatsexamen
08/2003-07/2004	Promotionsstipendium (Loder-Stipendium) für klinisch orientierte Forschung der Jenapharm GmbH & Co. KG Jena und Beurlaubung für 2 Semester
12/2005	3. Staatsexamen und Approbation als Arzt
seit 02/2006	Assistenzarzt in der Abt. für Unfallchirurgie und Orthopädische Chirurgie, BG-Unfallklinik Frankfurt/Main

Bickenbach, am 01.08.2006

## 9.4 Danksagung

Bei meinem Hochschullehrer und Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. habil. Th. Wahlers möchte ich mich sehr herzlich für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung diese interessante und vielseitige Dissertation anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern dieser Arbeit. Herrn Dr. med. H. Brandes danke ich für die vorzügliche Betreuung bei den Versuchen und seine Unterstützung bei der Bearbeitung dieses Themas. Herrn Dr. med. P. Rahmanian verdanke ich nach der Übernahme meiner Betreuung wertvolle Anregungen und viele hilfreiche Diskussionen. Er hat, nicht zuletzt durch sein kritisches Lesen des Manuskripts, maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch Herr PD Dr. med. habil Th. Wittwer sei erwähnt, der nach dem Wechsel von Prof. Wahlers nach Köln die weitere wissenschaftliche Betreuung an der FSU Jena bis zur Fertigstellung des Manuskriptes übernommen hat.

Ganz besonders danke ich auch Frau Dipl. Biol. H. Beinhauer für ihre Arbeit bei der Aufbereitung der Biopsien und ihre Unterstützung bei der Auswertung. Ohne ihre Hilfe bei allen größeren und kleineren Problemen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. phil. habil. G. F. Jirikowski danke ich für die Möglichkeit, die immunhistochemischen Färbungen und das Mikroskopieren der Schnitte in seinem Labor durchführen zu können.

Danken möchte ich Herrn Dr. med. vet. Th. Müller, Herrn Dr. med. vet. H. Schubert und allen anderen Mitarbeitern im Institut für Versuchstierkunde, im herzchirurgischen Forschungslabor und der Kardiotechnik für die sehr gute Zusammenarbeit und Betreuung der Versuche.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Förderverein des Klinikums und der Jenapharm GmbH & Co. KG für die Gewährung des Promotionsstipendiums.

Ich danke meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und immer für mich da war, und Magdalena Karpinska für alle Geduld, ihr Verständnis und ihre Hilfe bei meiner Arbeit. Ohne sie wäre diese Dissertation nicht gelungen. **Danke!!!**

## 9.5 Publikationen

Daten aus dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Rahmanian PB, Baumbach H, Becker L, Brandes H, Beinhauer H, Wahlers T. 2005. Comparison of crystalloid and blood cardioplegia and it's influence on apoptosis after prolonged ischemia during cardiopulmonary bypass in large animal model.

Thorac Cardiovasc Surg, 53 (Suppl 1:18)

Präsentiert auf der 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) 13.02.2005 - 16.02.2005 in Hamburg.



## 9.6 Stipendium

# Urkunde

Der Förderverein des Klinikums  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena e. V.

verleiht das

**„Loder – Stipendium“**

gestiftet von der Jenapharm GmbH & Co. KG

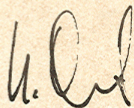
an

**Herrn Lars Becker**

in Abstimmung mit der Medizinischen Fakultät und  
der Jenapharm GmbH & Co. KG  
für die Durchführung einer Promotionsarbeit mit dem Thema:

*„Zeitverlauf der Apoptose am Myocard nach prolongierter  
Ischämie im Vergleich von zwei Kardioplegieverfahren“*

Jena, im Mai 2004



Prof. Dr. Konrad Reinhart  
Vorsitzender des Fördervereins



Isabel Rothe  
Geschäftsführerin  
Jenapharm GmbH & Co. KG